

# Elektromigrationsverfahren in der Peptidanalytik

Trennung von diastereomeren Peptiden mittels  
Kapillarelektrochromatographie und Entwicklung eines  
kapillarzonenerelektrophoretischen Enzym-Assays für Sirtuine



---

seit 1558

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von  
**Dipl.-Pharm. Ronny Ludewig**

geboren am 24. Januar 1981  
in Bad Langensalza

1. Gutachter(in): Prof. Dr. Gerhard Scriba, FSU Jena

2. Gutachter(in): Prof. Dr. Ute Pyell, Philipps-Universität Marburg

3. Gutachter(in): PD Dr. Andreas Seeling, FSU Jena

Tag der Verteidigung: 15. Oktober 2010

Es ist egal, was du bist,  
Hauptsache ist, es macht dich glücklich!

**FARIN URLAUB (\* 1963)**

## DANKSAGUNG

---

Die praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von April 2006 bis Mai 2010 am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Scriba angefertigt. Bei ihm möchte ich mich für die Vergabe des interessanten Themas, seine stetige Diskussionsbereitschaft und die Schaffung der angenehmen Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonderer Dank gilt ihm für seine Unterstützung während meines wissenschaftlichen Austausches in China.

Herrn Prof. Dr. Jochen Lehmann und Herrn PD Dr. Andreas Seeling danke ich für ihre wertvollen Anregungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit während der zahlreichen Doktorandenseminare und Tagungen.

Für die erfolgreiche Zusammenarbeit in gemeinsamen Projekten danke ich den Kooperationspartnern Prof. Dr. Hanfa Zou, Dr. Jing Dong, Dr. Sandor Nietzsche, Dr. Yi Fan, PD Dr. Diana Imhof und ihren Mitarbeitern sowie Prof. Dr. Christian Neusüß und seinen Mitarbeiterinnen Angelina Taichrib und Svenja-Catherina Bunz, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Martina Hense danke ich für die synthetischen Arbeiten und für das entspannte Laborklima während meiner gesamten Promotionszeit.

Herzlich danken möchte ich auch allen Kollegen, die durch ihre unkomplizierte und freundliche Art zur förderlichen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Durch die vielen wissenschaftlichen und privaten Gespräche sowie die gemeinsamen Erfahrungen während verschiedenster Institutsausflüge und Dachterrassen-Events wird mir die Zeit meiner Promotion in Jena in bester Erinnerung bleiben.

Christin Weisgerber und Hans Abromeit danke ich für die Anmerkungen bei der Durchsicht der Arbeit sowie Franziska Müller und Carolin Roegler für „the common battle in the global format of dissertations“.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Bandkollegen Martin Fitzner und Stefan Setzepfandt sowie meiner besten Freundin Kathleen Rothemann für die tolle Zeit neben meiner Promotion bedanken. Sie unterstützten mich fortwährend in meinem Vorhaben und schafften dennoch einen Ausgleich zu meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

Mein größter und besonderer Dank gilt meiner Familie, welche stets hinter mir gestanden hat, und meiner Freundin Alexandra Hertrampf, welche mich vor allem in der letzten Phase meiner Promotionszeit unterstützt hat und viel Verständnis aufbringen musste.

Ferner gilt mein Dank allen, die, ohne namentlich erwähnt zu sein, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Analytische Trennverfahren für Peptide .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Peptide .....	1
1.1.2	Trennverfahren .....	2
1.2	<b>Kapillarelektrophorese (CE).....</b>	<b>3</b>
1.2.1	Entwicklung der Kapillarelektrophorese .....	3
1.2.2	Trennprinzip der Kapillarelektrophorese.....	3
1.3	<b>Kapillarelektrochromatographie (CEC) .....</b>	<b>5</b>
1.3.1	Gepackte Kapillaren.....	6
1.3.2	Monolith-Kapillaren .....	7
1.4	<b>Elektromigrationsverfahren zur Charakterisierung von Enzymen .....</b>	<b>11</b>
1.4.1	Heterogener Enzymassay .....	11
1.4.2	Homogener Enzymassay .....	11
1.4.3	Sirtuine - Enzymfamilie, Vorkommen, Funktionen .....	12
<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Manuskripte .....</b>	<b>15</b>
	Manuskript 1.....	16
	Manuskript 2.....	22
	Manuskript 3.....	42
	Manuskript 4.....	50
<b>4</b>	<b>Bisher unveröffentlichte Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>Gesamtdiskussion .....</b>	<b>63</b>
5.1	<b>Einfluss stationärer Phasen auf die Trenneffizienz in der CEC .....</b>	<b>63</b>
5.1.1	Synthese und Charakterisierung der Monolithe.....	63
5.1.2	Präzisionen des WCX-Monolithen.....	66
5.1.3	Trennungen von Peptiden mit SCX-, WCX- und RP-Monolithen .....	67
5.2	<b>Einfluss der mobilen Phase auf die Trenneffizienz in der CEC .....</b>	<b>69</b>
5.2.1	Anteil des organischen Lösungsmittels .....	69
5.2.2	Pufferkonzentration .....	70
5.2.3	pH-Wert .....	71

---

<b>5.3</b>	<b>Trenneffizienz der CEC im Vergleich zur CZE.....</b>	<b>72</b>
<b>5.4</b>	<b>Anwendungen der Elektromigrationsverfahren.....</b>	<b>75</b>
5.4.1	Analytik des ACTH-Analogons Tetracosactid .....	75
5.4.2	Sirtuin-Enzym-Assay .....	76
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>87</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	87
8.2	Symbolverzeichnis .....	88
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>I</b>
	Curriculum vitae.....	I
	Publikations- und Tagungsbeitragsverzeichnis .....	II
	Eigenständigkeitserklärung .....	IV

# 1 Einleitung

## 1.1 Analytische Trennverfahren für Peptide

### 1.1.1 Peptide

Peptide sind eine wichtige Klasse von Verbindungen mit verschiedenen biologischen Funktionen. Viele von ihnen sind pharmakologisch aktiv und regulieren biologische Prozesse im Organismus z.B. als Hormone, Neurotransmitter, Enzyme und Enzyminhibitoren, Antibiotika und Rezeptorliganden. Darüber hinaus spielen Peptidanaloga und Peptidomimetika eine wichtige Rolle als Arzneistoffe<sup>[1]</sup>. Die Zahl der peptidischen Pharmazeutika ist durch die Entwicklung in der Biotechnologie in den letzten Jahren rasant gestiegen. Über 50 rekombinant hergestellte Peptide sind zugelassen. Mehr als 40 Produkte befinden sich in der Registrierungsperiode und Phase III der klinischen Prüfung. Weitere 60 Peptide durchlaufen die Phase II<sup>[2]</sup>. Die Tabelle 1 zeigt eine Auswahl pharmakotherapeutischer Peptide<sup>[3]</sup>.

**Tabelle 1.** Auswahl und Anwendung von pharmakotherapeutischen Peptiden sowie Anzahl der Aminosäuren.

Wirkstoff (Peptid)	Anwendung	Anzahl der Aminosäuren
Octretid	Behandlung von Akromegalie	8
Desmopressin	Hemmung der Wasserausscheidung	8
Buserelin	Vorbereitung der Ovulationsinduktion	9
Oxytocin	Geburtseinleitung	9
Gonadorelin	Hypothalamische Ovarialinsuffizienz	10
Ciclosporin	Unterdrückung der Immunabwehr	11
Tetracosactid	Stimulation der Hydrocortisonproduktion	24

Tetracosactid (Handelsname: Synacthen®) kommt als Tetracosactidhexaacetat in einer Injektionslösung zum Einsatz<sup>[3]</sup> und stellt ein synthetisches Analogon zum Adrenocorticotropin (ACTH) dar. ACTH ist ein aus 39 Aminosäuren aufgebautes Peptidhormon, welches eine wichtige physiologische Rolle bei der Stimulation der Hydrocortisonproduktion spielt. Es wurde vor einigen Jahrzehnten als Faktor des Hypothalamus, der Hypophyse sowie der Nebenniere identifiziert. Zahlreiche Studien zur Strukturaufklärung wurden durchgeführt<sup>[4-6]</sup> und es fanden Untersuchungen zu

synthetischen Analoga<sup>[7]</sup>, wie Tetracosactid, statt. Tetracosactid besteht im Gegensatz zum ACTH nur aus den ersten 24 Aminosäuren, da herausgefunden wurde, dass diese für die physiologische Wirkung essentiell sind. Gleichzeitig ist das allergische Potential reduziert<sup>[8]</sup>. Jedoch wurde aufgrund von Missbrauchsfällen im Sportbereich Tetracosactid von der Welt-Anti-Doping Agentur (WADA) auf die Stoffverbotsliste gesetzt. Thevis et al. entwickelten ein LC-MS/MS-Verfahren für den Nachweis von Tetracosactid in Plasmaproben<sup>[9]</sup>.

Während der Entwicklung, Lagerung und Lieferung können Peptide einem chemischen und physikalisch-chemischen Abbau unterliegen. Dazu zählen Oxidation, Hydrolyse, Isomerisierung, Enantiomerenbildung, Deamidierung, Aggregation und Oberflächenadsorption<sup>[10]</sup>. Diese Prozesse führen zu einem Verlust der Struktur und Funktion und können im schlechtesten Fall toxische Abbauprodukte bilden. Deshalb ist es für diese peptidischen Arzneistoffe wichtig, ein geeignetes Verfahren zu finden, mit dem sich Verunreinigungen analysieren und identifizieren lassen, um sie in einer pharmazeutischen Formulierung zu begrenzen. Tetracosactid ist im Ph.Eur. monographiert und wird bisher mittels HPLC auf verwandte Substanzen geprüft<sup>[11]</sup>.

### 1.1.2 Trennverfahren

Mit dem Beginn Peptide analytisch zu trennen wurden die Techniken der Dünnschichtchromatographie (TLC)<sup>[12]</sup>, der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)<sup>[13]</sup> und der Gaschromatographie (GC)<sup>[14]</sup> angewendet. Während bei der TLC die Empfindlichkeit der Detektion zu gering war und bei der GC die vorherige Derivatisierung ein Problem darstellte, war die HPLC das Mittel der ersten Wahl. Die pharmazeutische Analytik, besonders Peptidanalytik, ist nach wie vor der größte Sektor für flüssigkeitschromatographische Anwendungen in den Bereichen Forschung und Entwicklung sowie Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle<sup>[15]</sup>. Gegen Ende der 1970er Jahre begann, neben den chromatographischen Methoden, die Entwicklung der Elektromigrationsverfahren, zu denen die Gelelektrophorese (GE) und die Kapillarelektrophorese (CE) zählen<sup>[16;17]</sup>. Die GE dient in erster Hand der Trennung von großen Peptiden und Proteinen. Hingegen wird die CE vorrangig als analytisches Verfahren zur Trennung kleiner Peptide, speziell Peptidisomere<sup>[18-22]</sup>, genutzt. Besonders im pharmazeutischen Bereich hat sie sich in der Qualitätsuntersuchung einiger Peptide etabliert<sup>[23;24]</sup> und ist in verschiedenen Arzneibüchern, z.B. Ph.Eur. 6.0<sup>[25]</sup> und USP 32<sup>[26]</sup>, verankert.

Man unterteilt die CE in Kapillarzonenelektrophorese (CZE), Mizellarelektrokinetische Chromatographie (MEKC), mikroemulsionselektrokinetische Chromatographie (MEEKC), Kapillargelelektrophorese (CGE), isoelektrische Fokussierung (CIEF), Kapillar-isotachophorese (CITP) und Kapillarelektrochromatographie (CEC). Die am häufigsten angewendete Technik ist die CZE. Aus diesem Grund werden die Begriffe CZE und CE sehr häufig als Synonym verwendet. Die Probenauftragung erfolgt bei der CZE als schmales Band. Nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes bewegt sich jede Komponente der Probe aufgrund ihrer Mobilität, so dass sich im Idealfall reine Zonen mit jeweils nur einer Komponente ausbilden.

## 1.2 Kapillarelektrophorese (CE)

### 1.2.1 Entwicklung der Kapillarelektrophorese

Der Schwede Arne Wilhelm Kaurin Tiselius (1902 - 1971) legte die Grundlagen für die analytische Nutzung der Elektrophorese, wofür er 1948 den Nobelpreis für Chemie „für seine Forschungen zur Elektrophorese und Adsorption in der Analytik, insbesondere für seine Entdeckungen über die komplexe Natur von Blutserum-Proteinen“ erhielt<sup>[27]</sup>. Zu dieser Zeit waren Papier- oder Gelelektrophorese gebräuchlich. Diese Verfahren wiesen einige Nachteile auf. Es gab Probleme in der Detektion, da die getrennten Substanzen auf dem Träger erst angefärbt werden mussten. Jedoch konnte die Bildung Joule'scher Wärme, die durch das Anlegen hoher Spannungen hervorgerufen wird, zur Austrocknung des Trägers führen. Im Gegensatz dazu führen niedrige Spannungen zu stark verlängerten Analysenzeiten. Die Trennleistung niedermolekularer, strukturähnlicher Substanzen war sehr gering. Um diese Nachteile zu beheben, führten Jorgenson und Lukacs 1981 die Quarzkapillare in die Elektrophorese ein<sup>[28]</sup>. Aufgrund des geringen Innendurchmessers der Kapillaren war das Problem der thermischen Konvektion deutlich reduziert. Die Wärmeentwicklung innerhalb der Kapillare wird heutzutage durch Kühlungssysteme kompensiert.

### 1.2.2 Trennprinzip der Kapillarelektrophorese

Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Teilchen in einer Pufferlösung unter dem Einfluss eines elektrischen Gleichstromfeldes<sup>[29-31]</sup>. Ein geladenes Teilchen mit der Ladung  $q$  erfährt in einem elektrischen Feld der Feldstärke  $E$  folgende Kraft  $F_1$ .

$$F_1 = q \cdot E \quad (1)$$

Gleichzeitig wirkt, nach dem Gesetz von Stokes, auf dieses Teilchen eine Gegenkraft  $F_2$ .

$$F_2 = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v_{ep} \quad (2)$$

Hierbei ist  $\eta$  die Viskosität und  $r$  der Stokesche Radius des Ions, der auch die Solvathülle mit beinhaltet. Eine direkte Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit  $v_{ep}$  aufgrund der molekül- und pufferspezifischen Größen ist jedoch nicht möglich, da der Stokesche Radius meist nicht bekannt ist und mit dem messbaren Ionenradius in Kristallgittern nicht korreliert. Die Zahl 6 gilt unter Annahme sphärischer Teilchen und ist kleiner für kleine Ionen, deren Größe den Lösungsmittelmolekülen entspricht<sup>[31]</sup>. Betrachtet man den Gleichgewichtszustand, ergibt sich daraus die Gleichung 3 zur Wanderungsgeschwindigkeit  $v_{ep}$  im elektrischen Feld.

$$v_{ep} = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (3)$$

Die elektrophoretische Mobilität  $\mu_{ep}$  der Ionen errechnet sich mit der folgenden Gleichung.

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (4)$$

Aus Gleichung 4 ist ersichtlich, dass mit steigender Ladung des Teilchens die elektrophoretische Mobilität zunimmt. Ein größerer Radius  $r$  dagegen führt zu einer geringeren Mobilität. Somit weisen kleine und mehrfach geladene Teilchen eine höhere elektrophoretische Mobilität auf als Teilchen mit großem Radius und geringerer Ladungsdichte.

Bei unbehandelten Kapillaren werden die Silanolgruppen der Innenwand teilweise deprotoniert und diese dadurch negativ geladen, wenn der pH-Wert der sich darin befindenden Pufferlösung größer als 2,5 ist. Elektrostatische Anziehungskräfte führen zur Ausbildung der Stern'schen Doppelschicht, wobei Kationen aus der Pufferlösung in einer starren und einer diffusen Schicht an die innere Oberfläche der Kapillare angelagert werden. Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes bewegen sich die positiv geladenen Ionen aus der diffusen Grenzschicht in Richtung Kathode. Aufgrund des osmotischen Effekts, welcher durch diese Bewegung hervorgerufen wird, entsteht ein Nettostrom des Puffers in Richtung Kathode. Dieser wird als elektroosmotischer Fluss (EOF) bezeichnet.

Die elektroosmotische Mobilität  $\mu_{eo}$  ist dabei abhängig von den Dielektrizitätskonstanten des Mediums  $\epsilon_r$  und des Vakuums  $\epsilon_0$ , der Viskosität des Puffers  $\eta$  und vom Zeta-Potential  $\zeta_w$  an der inneren Kapillarwand.

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot \zeta_w}{\eta} \quad (5)$$

Die effektive Gesamtmobilität  $\mu_{eff}$  der Teilchen im elektrischen Feld setzt sich aus der elektrophoretischen und elektroosmotischen Mobilität zusammen.

$$\mu_{eff} = \mu_{ep} + \mu_{eo} \quad (6)$$

Die Gesamtmobilität kann somit maßgeblich durch Verringerung der Viskosität erhöht werden. Bei hohen Konzentrationen besitzt der Puffer eine hohe Viskosität, wodurch die effektive Mobilität verringert ist, was zu langen Migrationszeiten führen kann. Um diesem Phänomen entgegenzuwirken, kann dem Puffer ein organisches Lösungsmittel zugesetzt werden, da dieses eine kleinere Viskosität als Wasser aufweist. Dabei fällt die Wahl sehr oft auf Methanol (MeOH) oder Acetonitril (ACN), deren Viskositäten bei Raumtemperatur (RT) bei 0,551 resp. 0,345 mPa·s liegen<sup>[32]</sup>. Entscheidend ist jedoch die Viskosität der Wasser-Lösungsmittel-Gemische. Hier liegt der Vorteil beim ACN, da die Viskosität von Alkohol-Wasser-Mischungen wesentlich höher ist als von Wasser (0,891 mPa·s bei RT), resp. ACN-Wasser-Mischungen<sup>[33]</sup>. Aus diesem Grund finden letztgenannte häufiger Anwendung in chromatographischen Methoden, wie HPLC oder CEC.

### 1.3 Kapillarelektrochromatographie (CEC)

Die CEC wird als „Hybrid-Technik“ aus HPLC und CZE bezeichnet<sup>[34-38]</sup>. Der Grund liegt in der Verknüpfung der hohen Selektivität durch Verwendung spezifischer stationärer Phasen aus dem Bereich der HPLC und der hohen Trenneffizienz der CZE. Die Fortbewegung von Substanzen erfolgt wie bei der CZE durch den Einfluss des elektrischen Feldes, wobei durch die Wechselwirkungen mit der stationären Phase verbesserte Trennungen erreicht werden können. Im Gegensatz zur CZE ist diese Interaktion erwünscht, da eine Erhöhung der Effizienz erzielt wird<sup>[39]</sup>. Aus diesen Gründen finden in der CEC Vorgänge der Migration und Retention statt. Durch die angelegte Spannung führt der EOF als Pumpe zu verringerten Bodenhöhen, da das für die CZE charakteristische stempelförmige Profil entsteht und nicht der parabolische Fluss, wie in der HPLC. Die Verweildauer der Analyten in der Kapillare bis zur Detektion wird im Gegensatz zur CZE jedoch als Retentionszeit bezeichnet.

Erstmals untersuchte Pretorius 1974 diese Hybridtechnik bei der Auftrennung von Steroiden. Dabei verwendete er zwei Kieselgelplatten, wobei an einer der Platten ein Strom von  $2000 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$  angelegt wurde. Eine bessere Trennung wurde auf der stromdurchflossenen Platte erzielt<sup>[40]</sup>. In einem elektrisch angetriebenen System ist die Geschwindigkeit zwar von der Größe des Analyten, aber nicht vom Partikeldurchmesser der stationären Phase abhängig. Dadurch können für die Befüllung von Kapillaren unterschiedliche Materialien verschiedenster Größen verwendet werden. Jedoch erst 15 Jahre nach Pretorius entwickelte man Kapillaren mit sehr kleinen Durchmessern zur Reduzierung der Wärmeentwicklung. Die durch Konvektionen hervorgerufenen schlechten Trennungen wurden vermieden<sup>[41]</sup>. Aus der Gleichung 7 nach Knox et.al wird ersichtlich, dass der Temperaturunterschied  $\Delta T$  mit dem Quadrat des Kapillardurchmessers  $d_c$  steigt ( $Q$  - Wärmeentwicklungsrate pro Volumeneinheit der Kapillare,  $K$  - Wärmeleitfähigkeit)<sup>[42]</sup>.

$$\Delta T = \frac{Q \cdot d_c^2}{16 \cdot K} \quad (7)$$

Betrachtet man die stationären Phasen in der CEC, so unterscheidet man in erster Linie zwischen Open-Tubular-Kapillaren (OT-Kapillaren) und gefüllten Kapillaren. Bei OT-Kapillaren ist die innere Oberfläche beschichtet und man findet diese sehr häufig in GC-Applikationen. Bei den gefüllten Kapillaren differenziert man zwischen quervernetzten Polymeren (Monolithe) und gepackten Kapillaren, welche mikrosphärische Feststoffpartikel enthalten. Beide bilden ein 3D-Netzwerk, welches die Kapillare ausfüllt.

### 1.3.1 Gepackte Kapillaren

Der Aufwand zur Herstellung von gepackten Kapillaren mit mikrosphärischen Feststoffpartikeln ist höher als bei der Fertigung von Monolithen. In Anlehnung an die Flüssigkeitschromatographie fanden zunächst Kapillaren auf der Basis von Kieselgel große Anwendung in der CEC. Später setzte man diese zu *n*-Octadecyl- und *n*-Octyl-modifizierten chemisch gebundenen Phasen um und erhielt bessere Trennungen für Proteine und Peptide, ähnlich der HPLC<sup>[43]</sup>. Bisher ist die Umkehrchromatographie die Methode der Wahl für die Trennung von Peptidgemischen. Bei der Verwendung von gepackten Kapillaren ist es sehr wichtig, die Partikel vor dem „Auslaufen“ zu schützen. Dieses erfolgt durch das Brennen von Fritten. Die gepackten Kapillaren weisen gegenüber den Open-Tubular-Kapillaren kürzere Retentionszeiten und größere Säulen-Kapazitäten auf.



Kapillaren mit octadecylsilylierten Partikeln weisen keine Eigenladung auf. Da man für Neutralteilchen allerdings den EOF benötigt, um diese zur Kathode und somit in Richtung des Detektors zu transportieren, fand eine Anpassung der mobilen Phase statt. Dieses wurde durch den Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS), unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration, ermöglicht. Durch die Wechselwirkung mit der RP-Phase konnte die Trennung von Neutralstoffen erreicht werden<sup>[44-48]</sup>. Um die Abhängigkeit eines Mizellbildners in der mobilen Phase zu umgehen, verwendete man für die Befüllung der Kapillaren gemischte Partikel, welche neben octadecylsilylierten Gruppen Ionenaustauscher enthielten, um die Ladung der Oberflächen zu erhöhen. Die Mobilität verändert sich bei der Verwendung gepackter Säulen nach Overbeek et al. aus Gleichung 5 zu Gleichung 8, wobei  $\zeta_P$  das Zetapotential der Partikeloberfläche und  $\sigma_{\text{gepackt}}$  sowie  $\sigma_{\text{offen}}$  die Leitfähigkeit einer gepackten resp. offenen Kapillare ist<sup>[49]</sup>.

$$\mu_{\text{eo}} = \frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot \zeta_P}{\eta} \cdot \left( \frac{\sigma_{\text{gepackt}}}{\sigma_{\text{offen}}} \right) \quad (8)$$

Gepackte Kapillaren neigen dazu, Gasbläschen während der Messung zu bilden, was auf ein unzureichendes Sintern des Packungsmaterials an den eingearbeiteten Fritten zurückzuführen ist. Die gebildeten Gase sind der Grund für Schwankungen oder einen möglichen Zusammenbruch des Stromflusses während einer Analyse. Eine Entgasung des Puffers ist daher unbedingt notwendig. Ein weiterer Grund für die Entstehung der Gasbläschen ist die Temperaturerhöhung in der Kapillare, welche durch Anlegen eines Stroms in der CEC etwa 1000-mal größer ist als in der HPLC<sup>[41]</sup>. Ein angelegter Überdruck auf die Gefäße an Ein- und Auslass der Kapillare kann zur Reduktion der Gasbläschen führen<sup>[50]</sup>.

### 1.3.2 Monolith-Kapillaren

Monolithe sind „kontinuierliche Betten“, welche aus Polymeren bestehen. Ein Brennen von Fritten zum Schutz vor dem Austreten von Feststoffpartikeln aus der Kapillare ist bei den Monolithen somit nicht notwendig. Damit besitzen sie einen wesentlichen Vorteil gegenüber den gepackten Kapillaren.

Die stabförmige Struktur innerhalb der Kapillare weist Poren auf. Die enthaltenen Polymere können entweder eine stark vernetzte und starre Struktur aufweisen<sup>[51-58]</sup> oder sind weiche, gelartige Gebilde<sup>[59-65]</sup>.

### Einteilung von Monolithen

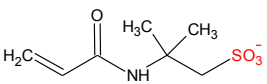
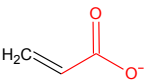
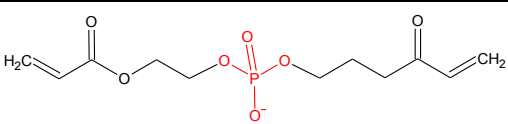
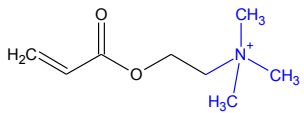
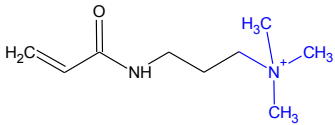
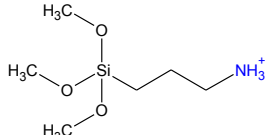
Monolithen können organischer Natur oder basieren auf Kieselgel. Das Hauptaugenmerk der Entwicklung von Monolithen liegt in der Wechselwirkung der Analyten mit der Oberfläche des entsprechenden Polymers. So unterscheidet man generell zwischen hydrophoben<sup>[66-68]</sup> und hydrophilen<sup>[69-72]</sup> Polymeren. Zusätzlich können zur Monomer-mischung Verbindungen in Form von Ionenaustauschern zugesetzt werden, die bei der Polymerisierung mit in das 3D-Netz eingebaut werden.

Dabei unterscheidet man nach der Ausbildung ihrer Ladung und Ladungsstärke in vier Formen:

- starke Kationenaustauscher (SCX)
- schwache Kationenaustauscher (WCX)
- starke Anionenaustauscher (SAX)
- schwache Anionenaustauscher (WAX)

Für die Analytik von Peptiden finden je nach Art der Struktur verschiedene Monomere Einsatz (Tabelle 2).

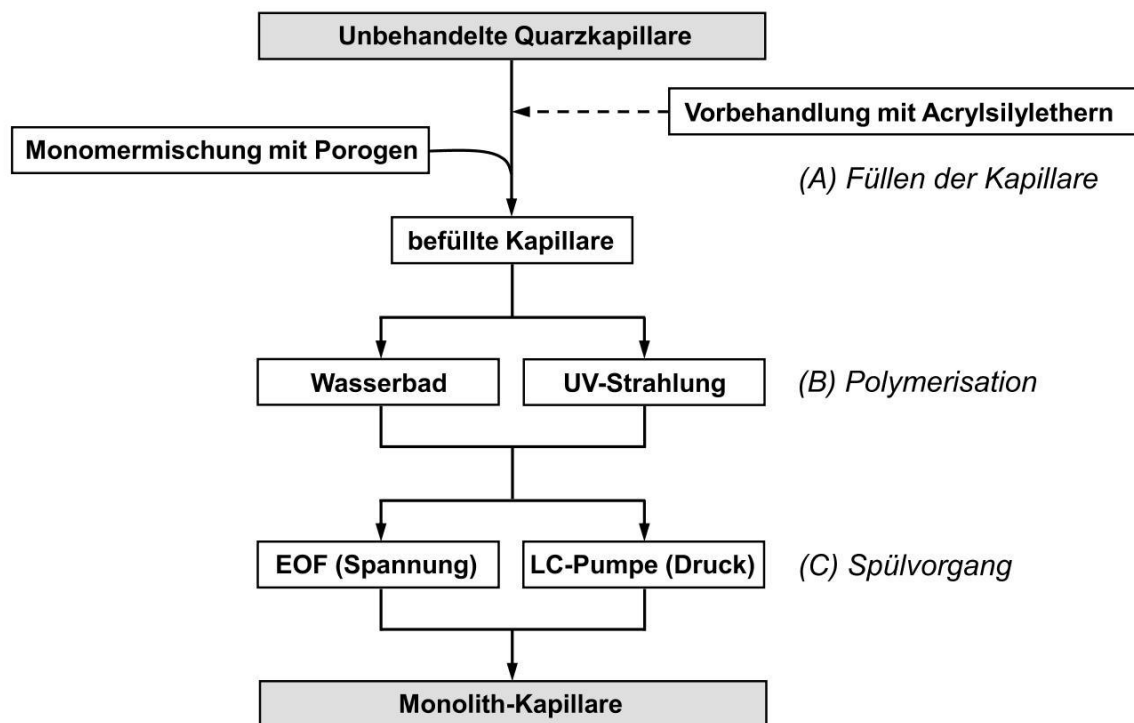
**Tabelle 2.** Auswahl von beschriebenen Austauscher-Monomeren (SCX, WCX, SAX, WAX) für Monolithen.

Ionen-austauscher	Austauscher-funktion	Beispielstruktur eines Austauscher-Monomers (mit Ladung)	Literatur
starke Kationen- Austauscher (SCX)	$R-SO_3H$		[37;73;74]
	$R-COOH$		[75;76]
schwache Kationen- Austauscher (WCX)	$R-OPO_3H-R$		[77]
	$R-N(CH_3)_3Cl$		[78;79]
starke Anionen- Austauscher (SAX)	$R-N(CH_3)_3Cl$		[80]
	$R-NH_3Cl$		[81;82]
schwache Anionen- Austauscher (WAX)	$R-NH_3Cl$		

Weiterhin lassen sich Monolithe nach der Art ihres Lösungsmittels der Monomere, welches während der Polymerisation als Porenbildner fungiert, einteilen. Ein wichtiger Aspekt bei der Herstellung von Monolithen ist das Lösungsvermögen der Monomere. Zu Beginn der Entwicklung wurden Monolith-Polymere auf rein wässriger Basis hergestellt, die erstmals 1997 von Ericson und Hjerten beschrieben wurden<sup>[53]</sup>. Ein wässriger Phosphatpuffer diente nicht nur als Lösungsmittel für 2-Hydroxyethylmethacrylat und Piperazindiacrylat, sondern auch als Porenbildner bei der anschließenden Polymerisation. Neben Acrylaten wurden auch Monolithe auf der Basis von Acrylamid entwickelt, wobei Piperazin- oder Methylenbisacrylamid als Quervernetzer verwendet wurden. Die Polymerisation wurde häufig durch Ammoniumperoxodisulfat in Kombination mit Tetramethylethyldiamin (TEMED) gestartet. Durch den Einsatz einer Dispersion von Octadecylmethacrylat in Wasser erzeugten Ericson et al. einen Monolithen mit Umkehrphase<sup>[65]</sup>. Trotz des Erfolges rein wässrige Monomerlösungen zur Polymerisation zu verwenden, konnte aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit einiger Monomere nicht auf einen Anteil an organischen Lösungsmitteln verzichtet werden. Auch dabei diente das Lösungsmittel gleichzeitig als Porogen. Vor allem bei der Verwendung hydrophober Monolithe war die Entwicklung von nicht-wässrigen Lösungen und Dispersionen erforderlich. Der Gebrauch von organischen Lösungsmitteln brachte den Vorteil, die Poreneigenschaften zu kontrollieren. Palm und Novotny verwendeten Mischungen aus N-Methylformamid und wässrigen Puffersystemen, um eine homogene Polymerisationslösung aus Acrylamid, Methylenbisacrylamid und verschiedenen Alkylacrylaten (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub> und C<sub>12</sub>) herzustellen<sup>[83]</sup>. Mit diesen Monolithen konnten aromatische Kohlenwasserstoffe, aber auch Kohlenhydrate und besonders kurzkettige Peptide mit einer Kettenlänge von zwei bis sechs Aminosäuren getrennt werden<sup>[83]</sup>. Neben Acrylamid und Acrylaten wurden auch auf Polystyren basierende Monolithe entwickelt, welche zur Trennung von Peptiden genutzt wurden. Gusev et al. verwendete eine Mischung aus Chlormethylstyren und Divinylbenzen in Anwesenheit verschiedener Lösungsmittel als Porenbildner<sup>[84]</sup>. Der Zusatz von Aminen, wie N,N-Dimethyloctylamin, führte zu einer Reaktion mit Chlormethylstyren. Dadurch wurden quartäre Ammoniumfunktionen herbeigeführt und somit permanente positive Ladungen innerhalb der Kapillare erzeugt. Mit diesem RP-Monolithen, der zum Ionenaustausch befähigt ist, ließen sich kleine isomere Tripeptide (Gly-Gly-Phe und Phe-Gly-Gly) sowie drei Angiotensine erfolgreich trennen.

### Prinzip der Herstellung organischer Monolithe

Die Präparation von Monolithen in Kapillaren findet typischerweise durch radikalische Polymerisation statt. Die Monomermischung enthält dafür Radikale, wie Azobisisobutyronitril (AIBN). Wie in der Abbildung 1 zu erkennen ist, wird die innere Oberfläche einer leeren Kapillare häufig mit Acrylsilylethern vorbehandelt. Dieser Schritt ist nicht obligat, führt jedoch zu stabileren Monolithen, da kovalente Bindungen zur Kapillarwand erzeugt werden. Die Kapillare wird mit der entsprechenden Monomerlösung befüllt (A) und beidseitig verschlossen. Um die radikalische Polymerisation auszulösen wird einerseits Wärme<sup>[85-87]</sup> in Form eines Wasserbads, zum anderen die Einstrahlung von UV-Licht<sup>[88-92]</sup>, angewendet (B). Anschließend muss die Kapillare von überschüssigen Reagenzien befreit werden, was durch Anlegen eines Druckes oder einer Spannung an die Enden der Kapillare erfolgt (C). Vor den Messungen muss die Monolith-Kapillare mit der zu verwendeten mobilen Phase equilibriert werden.



**Abbildung 1.** Allgemeines Prinzip zur Herstellung von Monolith-Kapillaren.

## **1.4 Elektromigrationsverfahren zur Charakterisierung von Enzymen**

Enzyme sind wichtige Biokatalysatoren für jeden lebenden Organismus. Sie katalysieren selektiv und effizient die chemischen Reaktionen der Zelle<sup>[93]</sup>. Verschiedene Techniken werden für Aktivitätsmessungen von Enzymen verwendet. Man unterscheidet heute hauptsächlich zwischen photometrischen, elektrochemischen, radiochemischen und trenntechnischen Verfahren. Welches analytische Verfahren angewendet wird, hängt sehr stark von den Kosten sowie der Verfügbarkeit der benötigten Ausstattung und Reagenzien ab. Elektromigrationsverfahren haben sich in den letzten 20 Jahren zu technisch ausgereiften Verfahren zur Charakterisierung von Enzymen entwickelt.

### **1.4.1 Heterogener Enzymassay**

Beim heterogenen Enzymassay mittels CZE ist eine der Komponenten, häufig das Enzym, für die enzymatische Reaktion an der Oberfläche der Kapillare immobilisiert. Die Lagerung der Kapillare ist sehr wichtig für die Stabilität des Enzyms. Die Substrate befinden sich in der Pufferlösung und nach Umsetzung zu den Produkten können diese direkt in oder nach Verlassen der Kapillare gemessen werden. Man verwendet den heterogenen Enzymassay hauptsächlich zur Ermittlung von Substraten oder Inhibitoren für bestimmte Enzyme.

### **1.4.2 Homogener Enzymassay**

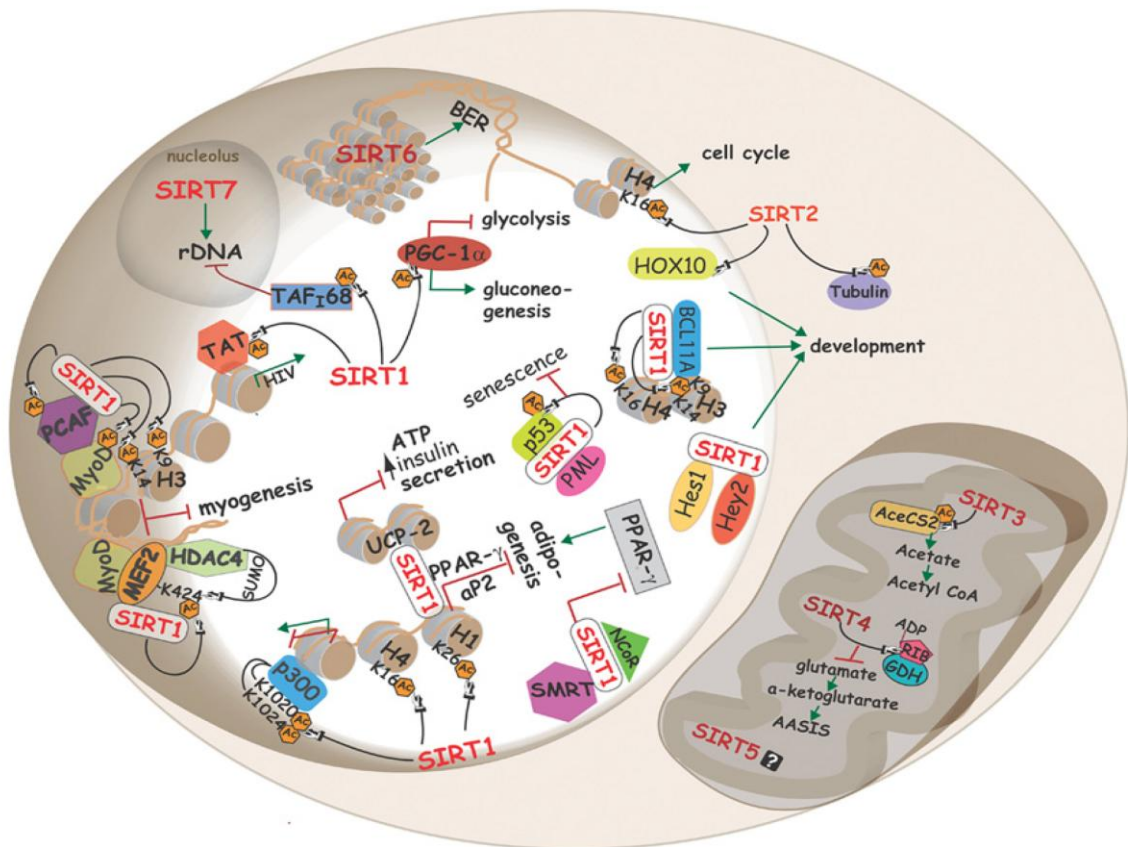
Der homogene Enzymassay wird vorwiegend zur Ermittlung der Enzymaktivität verwendet. Bei diesem Assay sind drei verschiedene Methoden beschrieben. Hinsichtlich des Ortes der Enzymreaktion unterscheidet man in präkapillar, kapillar und postkapillar, wobei die zwei erstgenannten Methoden die häufigste Anwendung finden. Beim präkapillaren Assay wird dem Inkubat in vorbestimmten Intervallen ein Aliquot entnommen und die Enzymreaktion durch Abkochen oder Zusatz eines Stoffes zur Denaturierung beendet. Bevor die Probe mittels CZE vermessen wird, erfolgt zur Abtrennung des denaturierten Proteins eine Zentrifugation der Probe, um ein Verstopfen der Kapillare zu vermeiden. Eine Vereinfachung stellt der kapillare Assay dar. Dabei werden das Enzym und das Substrat einzeln in die Kapillare injiziert. Um dabei die Enzymreaktion und eine Trennung der einzelnen Reaktionskomponenten zu ermöglichen sind unterschiedliche elektrophoretische Mobilitäten des Enzyms und des Substrats notwendig. Zur ersten Methode sind über 100 verschiedene Enzymassays publiziert, wobei die Detektion mit UV-VIS, Fluoreszenz oder laserinduzierter Fluoreszenz erfolgt<sup>[94]</sup>.

### 1.4.3 Sirtuine - Enzymfamilie, Vorkommen, Funktionen

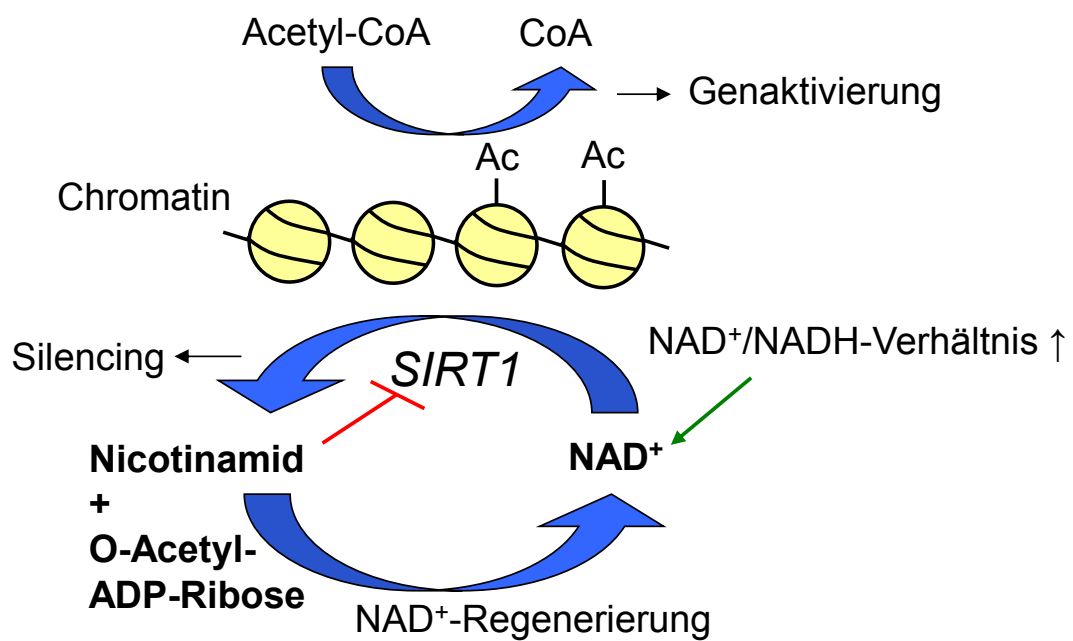
Der Name „Sirtuine“ leitet sich von *SIR* (*Silent Information Regulator*) ab und beschreibt die Herabsetzung der Rekombination ribosomaler DNA<sup>[95]</sup>. Es handelt sich dabei um eine Familie von Enzymen, die man in vielen Bereichen des Lebens findet. Das am intensivsten untersuchte Sirtuin-Gen ist *Sir2*<sup>[96-98]</sup> und wurde erstmals 1979 in *Saccharomyces cerevisiae* von Klar et.al. entdeckt<sup>[99]</sup>. Zu dieser Zeit wurde für *Sir2* noch der Begriff *MAR1* (mating-type Regulator 1) verwendet. Etwa acht Jahre später wurden durch Rine und Herskowitz weitere Isoformen dieser Genregulatoren entdeckt und es fand eine Änderung der Nomenklatur statt<sup>[100]</sup>. Im menschlichen Organismus sind bisher sieben Sirtuine (*SIRT1-7*) beschrieben<sup>[95]</sup>. Sie regulieren, neben der DNA-Rekombination, Reparaturen an der DNA und sind für die chromosomale Stabilität sowie für die Langlebigkeit der Zellen mit verantwortlich. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die zahlreichen Vorgänge, an denen Sirtuine in der menschlichen Zelle beteiligt sind. Die Sirtuine zählen zur Klasse 3 der Histondeacetylasen, katalysieren aber auch als NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase<sup>[101]</sup> die Modifizierung anderer Proteine, wie das p53 und können als Transferase von ADP-Ribosyl-Resten fungieren. *SIRT1* und *SIRT5* haben ausschließlich Deacetylase-Funktion, während die *SIRT2* und *SIRT3* zusätzlich eine Ribose auf Proteine übertragen können.

An Proteinen z.B. Histonen können Modifizierungen in Form der Acetylierung an den  $\epsilon$ -Aminofunktionen der Lysine stattfinden<sup>[102]</sup>. Die Sirtuine sind als Deacetylasen in der Lage, diese Acetylgruppen vom Lysin abzuspalten und auf NAD<sup>+</sup> zu übertragen<sup>[103]</sup>, wobei aus letzterem Nicotinamid freigesetzt wird (Abbildung 3). Durch diese Veränderung erhält die Aminosäure Lysin eine positive Ladung an der  $\epsilon$ -Aminofunktion. Diese erhöht die Affinität der Histone für das negativ geladene Phosphatgerüst der DNA. Eine Blockierung der DNA für Transkriptionsfaktoren ist die Folge wodurch die DNA-Transkription herunterreguliert wird.

Bei der zweiten Funktion der Sirtuine als Mono-ADP-Ribosyl-Transferasen wird der ADP-Ribosyl-Rest aus NAD<sup>+</sup> auf ein Protein übertragen, wobei ebenfalls Nicotinamid freigesetzt wird, welches die Enzymreaktion inhibiert<sup>[104]</sup>.



**Abbildung 2.** Zelluläre Funktionen von Sirtuinen (SIRT1-7) in einer menschlichen Zelle<sup>[95]</sup>.  
(Hemmung  $\dashv$ , Aktivierung  $\rightarrow$ )



**Abbildung 3.** Prinzip der Deacetylierung von Proteinen durch SIRT1 am Beispiel der Histone.  
(Hemmung  $\dashv$ , Aktivierung  $\rightarrow$ ).

## 2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit, welche sich in drei Teile gliedert, war der Einsatz der Migrationsverfahren Kapillarzonenoelektrophorese (CZE) und Kapillarelektrochromatographie (CEC) zur Analytik von Peptiden. Zur Trennung von diastereomeren Peptiden gibt es nur wenige Untersuchungen durch Elektromigrationsverfahren, insbesondere durch CEC. Aus diesem Grund beschäftigt sich der erste Teil mit der Isomerentrennung von Aspartyl-Peptiden mittels CEC. Im zweiten Teil steht die Analytik des ACTH-Analogons Tetracosactid im Mittelpunkt. Der dritte Teil umfasst die Entwicklung eines Enzymassays für Sirtuine, da auf der Basis von Migrationsverfahren bisher kein Assay für die Charakterisierung dieser Enzymfamilie existiert.

Daraus ergaben sich die folgenden Schwerpunkte:

### ***CEC-Trennung von Peptiden***

- Herstellung von Monolith-Kapillaren auf der Basis von Acrylamid- und Methacrylat-Monomeren durch in situ Polymerisation und Charakterisierung der Monolithe
- Ermittlung des Einflusses der synthetisierten Monolithen und der Zusammensetzung der mobilen Phase auf die Trennung von isomeren Peptiden, insbesondere von diastereomeren Aspartyl-Peptiden

### ***Tetracosactid-Analytik***

- Untersuchung der Reinheit des ACTH-Analogons Tetracosactid mittels CZE-UV und CZE-MS

### ***Sirtuin-Enzym-Assay***

- Synthese von Peptidsubstraten für Sirtuine
- Entwicklung und Validierung eines Elektromigrationsverfahrens zur Trennung der synthetisierten Modellpeptide
- Test der Eignung des CE-Verfahrens zum Screening von Inhibitoren für Sirtuine



### 3 Manuskripte

#### Manuskript 1

*Separation of peptide diastereomers using CEC and a hydrophobic monolithic column*

Ronny Ludewig, Jing Dong, Hanfa Zou, Gerhard K. E. Scriba; *Journal of Separation Science* **2010**, 33, 1085 - 1089.

#### Manuskript 2

*A weak cation-exchange monolith as stationary phase for the separation of peptide diastereomers by capillary electrochromatography*

Ronny Ludewig, Sandor Nietzsche, Gerhard K. E. Scriba; **2010 eingereicht.**

#### Manuskript 3

*Development of a capillary electrophoresis-based assay of sirtuin enzymes*

Yi Fan, Ronny Ludewig, Diana Imhof, Gerhard K. E. Scriba; *Electrophoresis* **2008**, 29, 3717 - 3723.

#### Manuskript 4

*9-Fluorenylmethoxycarbonyl-labeled peptides as substrates in a capillary electrophoresis-based assay for sirtuin enzymes*

Yi Fan, Ronny Ludewig, Gerhard K. E. Scriba; *Analytical Biochemistry* **2009**, 387, 243 - 248.

## Manuskript 1

### Separation of peptide diastereomers using CEC and a hydrophobic monolithic column

Ronny Ludewig, Jing Dong, Hanfa Zou, Gerhard K. E. Scriba.

*Journal of Separation Science* **2010**, 33, 1085 - 1089.

In diesem Manuskript wurde das Trennverhalten von kurzkettigen Peptiddiastereomeren mit Hilfe der Kapillarelektrochromatographie unter Verwendung eines hydrophoben Monolithen untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss der mobilen Phase durch Veränderungen in der Zusammensetzung untersucht. Die Isomere von  $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-L-PheOMe und L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH konnten erfolgreich mit dieser Methode getrennt werden, wobei eine vollständige Signalauflösung letzterer durch CZE und HPLC nicht möglich war. Zusätzlich konnte die Trennung der Diastereomere des ACTH-Analogons Tetracosactid (24 Aminosäuren) mit dieser Methodik erreicht werden.

**Eigenanteil:** Herstellung von Monolith-Kapillaren auf der Basis von Laurylmethacrylat, Auswahl der Peptiddiastereomere, Optimierung der Trennungen durch Veränderungen in der mobilen Phase, Auswertung der Daten, Erstellen des Manuskripts.

Ronny Ludewig<sup>1</sup>  
Jing Dong<sup>2</sup>  
Hanfa Zou<sup>2</sup>  
Gerhard K. E. Scriba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical  
and Medicinal Chemistry,  
School of Pharmacy, Jena,  
Germany

<sup>2</sup>National Chromatographic R&A  
Center, Dalian Institute of  
Chemical Physics, Dalian,  
P. R. China

Received November 12, 2009

Revised December 17, 2009

Accepted December 17, 2009

## Research Article

# Separation of peptide diastereomers using CEC and a hydrophobic monolithic column

A neutral hydrophobic monolith prepared by radical *in situ* copolymerization of lauryl methacrylate and ethylene dimethacrylate has been evaluated for the CEC separation of diastereomers of small peptides using acidic mobile phases containing ACN as organic modifier. Using an acidic mobile phase, the peptides migrated due to their own electrophoretic mobility. Hydrophobic interactions with the stationary phase contributed to the separation. Peptide mobility and resolution increased with increasing the ACN content. Retention times increased with the pH of the mobile phase. Peak resolution increased with buffer pH and concentration. Di- and tripeptides composed only of L-configured amino acids migrated faster than peptides containing D-amino acids. A mixture of isomeric Asp tripeptides that could not be completely resolved by either CZE or HPLC as well as the 24mer peptides tetracosactide and <sup>16</sup>[D-Lys]-tetracosactide could also be separated by CEC on the hydrophobic monolith.

**Keywords:** CEC / Neutral hydrophobic monolith / Peptide diastereomers / Peptide separation  
DOI 10.1002/jssc.200900739

## 1 Introduction

CEC has received considerable attention in recent years. CEC is considered a hybrid technique combining the high separation efficiency of CE with the high selectivity of HPLC stationary phases. Essentially all types of analytes that have been analyzed by HPLC or CE have also been investigated by CEC including the separation of peptides and proteins as summarized in recent reviews [1–3]. Most CEC peptide analyses have been carried out using peptides composed of the natural L-configured amino acids. Little information is available on the separation of peptide diastereomers by CEC although this is an important topic in analytical chemistry. Popa *et al.* [4] compared the separation of amphipathic  $\alpha$ -helical 18mer peptide diastereomers by CZE, MEKC and CEC. The diastereomeric pairs were obtained by the exchange of an L-amino acid by a D-amino acid. In most cases a higher resolution was obtained by CEC employing a C8-coated capillary (so-called open tubular CEC) in the presence of 25% 2,2,2-trifluoroethanol or 25% ethanol compared with CZE or MEKC conditions in bare fused-silica capillaries. Schmid *et al.* investigated a capillary packed with teicoplanin aglycone as a chiral stationary phase for the separation of diastereomers and enantiomers of di- and tripeptides possessing one or two chiral centers [5]. The diastereomers (and enantiomers) of the peptides could be resolved on the chiral stationary phase in the RP mode employing as mobile phases

triethylamine acetate based buffers containing ACN and/or methanol as organic modifier.

With regard to column technology in CEC, the majority of analytical methods have been developed using columns which are packed with a silica-based stationary phase. This approach has the advantage that numerous achiral and chiral stationary phases are available from HPLC. However, the frits which have to be prepared to prevent leakage of the stationary phases often cause bubble formation resulting in breakdown of the electric current. On the other hand, in monolithic columns which are prepared by *in situ* polymerization the stationary phase is bound to the inner wall of the capillary through covalent bonds preventing its leakage so that no frits are necessary. Various techniques for the preparation of monoliths have been reported as summarized recently [6–9].

This study was conducted to investigate the separation behavior of peptide diastereomers on a hydrophobic monolith prepared from *in situ* copolymerization of lauryl methacrylate and ethylene dimethacrylate. This monolith somewhat resembles the typical RP based on alkyl-silica which is often applied to peptide analysis. The monolith has been previously applied to separations of di- and tripeptides [10] but neither peptide diastereomers nor isomers of aspartyl peptides have been separated on this monolithic stationary phase so far.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemicals

1,4-Butanediol, 1-propanol, lauryl methacrylate, ethylene dimethacrylate,  $\gamma$ -methacryloxypropyltrimethoxysilane and

**Correspondence:** Professor Gerhard K. E. Scriba, Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, University of Jena, Philosophenweg 14, 07743 Jena, Germany  
**E-mail:** gerhard.scriba@uni-jena.de  
**Fax:** +49-3641-949802

azobisisobutyronitrile were purchased from Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, Germany). HPLC grade ACN and methanol were purchased from VWR International (Darmstadt, Germany). Ala-Ala, Ala-His, Ala-Leu, Ala-Phe, Ala-Trp and Ala-Tyr as well as their diastereomers were supplied by Bachem AG (Heidelberg, Germany). The diastereomers of Asp-PheOMe were prepared according to standard peptide chemistry procedures by condensation of the respective *N*-benzyloxycarbonyl-protected amino acid *N*-hydroxysuccinimide with the second amino acid in DMF followed by hydrogenolytic deprotection [11]. The isomers of Phe-Asp-Gly were synthesized by standard solid phase synthesis using 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate as coupling reagent and 1-hydroxybenzotriazole as additive as published [12]. The crude peptides were purified by preparative RP-HPLC using an ACN-0.1% v/v aqueous TFA gradient. Collected fractions were combined and lyophilized. Tetracosactide and [<sup>16</sup>p-Lys]-tetracosactide were supplied by the Federal Institute for Drugs and Medical Devices (BfArM, Bonn, Germany). Buffers and solutions were prepared in double distilled, deionized water, filtered (0.2 µm) and degassed by sonication.

## 2.2 Instrumentation

All experiments were carried out on a Beckman P/ACE 5510 instrument (Beckman, Fullerton, CA, USA). Fused-silica capillaries (75 µm id, 375 µm od) were obtained from BGB Analytik (Schlossbröckelheim, Germany). A LC-6A HPLC pump (Shimadzu, Duisburg, Germany) and a manual syringe pump (Unimicro Technologies, CA, USA) were used to flush the capillary columns.

## 2.3 Preparation of monolithic columns

Monoliths were prepared according to the procedure of Wu *et al.* [10]. Briefly, fused-silica capillaries were pretreated by rinsing with 0.1 M NaOH for 1 h and water until the effluent reached pH 7.0. After flushing with methanol for about 10 min, the capillaries were dried with nitrogen gas. The capillaries were filled with a 1:1 v/v dilution of  $\gamma$ -methacryloxypropyltrimethoxysilane in methanol, sealed at both ends with rubber and submerged in a water bath of 45°C overnight. Subsequently, the capillaries were rinsed with methanol and water. 500 µL of ethylene dimethacrylate, 600 µL lauryl methacrylate, 5 mg azobisisobutyronitrile were dissolved in 1100 µL of a mixture of 1-propanol and 1,4-butanediol (45:55 w/w). The resulting mixture was sonicated for 20 min, purged with nitrogen for 10 min and filled into the capillary using a syringe. The capillary ends were sealed with rubber and capillary was submerged in a 60°C water bath for 12 h. The resultant monolithic capillary column was washed with methanol for about 2 h using a HPLC pump to

remove unreacted monomers and porogens. The detection window was made by burning off 1–2 mm of the outer polyimide layer. The ashes of the organic monolith inside the column were flushed out with methanol for 30 min with a HPLC pump. The total lengths of the capillary columns were 27 or 37 cm, the effective lengths were 20 or 30 cm, respectively.

## 2.4 Electrochromatographic conditions

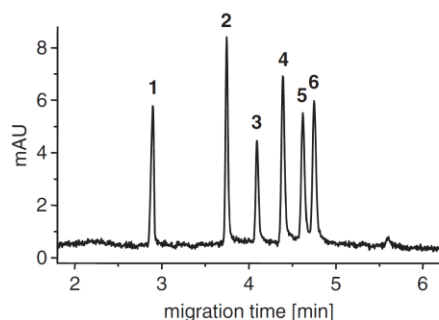
The mobile phases were prepared by mixing aqueous phosphoric acid and ACN. The pH was subsequently adjusted using diluted sodium hydroxide solution. The monolithic capillary was placed in the cartridge and flushed for about 20 min with the mobile phase using a manual pump. The capillary was subsequently placed in the instrument and equilibrated with the mobile phase by applying a voltage of 12 kV until a stable baseline was obtained. Samples were injected electrokinetically at 1 kV. CEC experiments were carried out at a temperature of 25°C and the detection wavelength was 214 nm.

## 3 Results and discussion

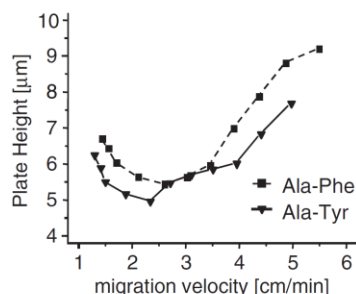
### 3.1 General performance of the monolithic column

The monolith was prepared by copolymerization of lauryl methacrylate and ethylene dimethacrylate according to a published procedure [10]. The efficiency was initially evaluated using a mixture of six dipeptides composed of Ala-His, Ala-Ala, Ala-Leu, Ala-Phe, Ala-Trp and Ala-Tyr. Using a 30 mM phosphate buffer, pH 3.0, which contained 40% ACN good separation of all analytes was achieved within 5 min (Fig. 1). At acidic pH the monolith has been shown to exhibit only an insignificant EOF [10]. Using the mobile phase with a pH below 4, the peptides are at least partially positively charged and migrate by their electrophoretic mobility. Interaction with the hydrophobic stationary phase contributes to their separation. Compared with CE using a 20/27 cm, 50 µm id fused-silica capillary under otherwise identical conditions the peptides could also be separated within 5 min (data not shown). However, the migration order of some peptides changed. Thus, Ala-Tyr migrated faster than Ala-Phe and Ala-Trp clearly illustrating the contribution of the interaction with the stationary phase in CEC to the overall separation. Moreover, peak resolution was higher and peaks were sharper in CEC compared with CE. A theoretical plate number between 173 000 and 223 000 plates/m was calculated for the peptides except for the first eluting Ala-His (89 000 plates/m). A plot of the migration velocity *versus* theoretical plate height for Ala-Phe and Ala-Tyr revealed optimal conditions in the range of 2–3 cm/min (Fig. 2).





**Figure 1.** Electrochromatogram of the CEC separation of six dipeptides containing Ala at the N-terminus. Experimental conditions: hydrophobic monolith 20 cm effective length (total length 27 cm)  $\times$  75  $\mu$ m capillary id; mobile phase: 30 mM phosphate buffer pH 3.0, containing 40% v/v ACN; applied voltage 12 kV; UV detection at 214 nm. (1) Ala-His, (2) Ala-Ala, (3) Ala-Leu, (4) Ala-Phe, (5) Ala-Trp, (6) Ala-Tyr.

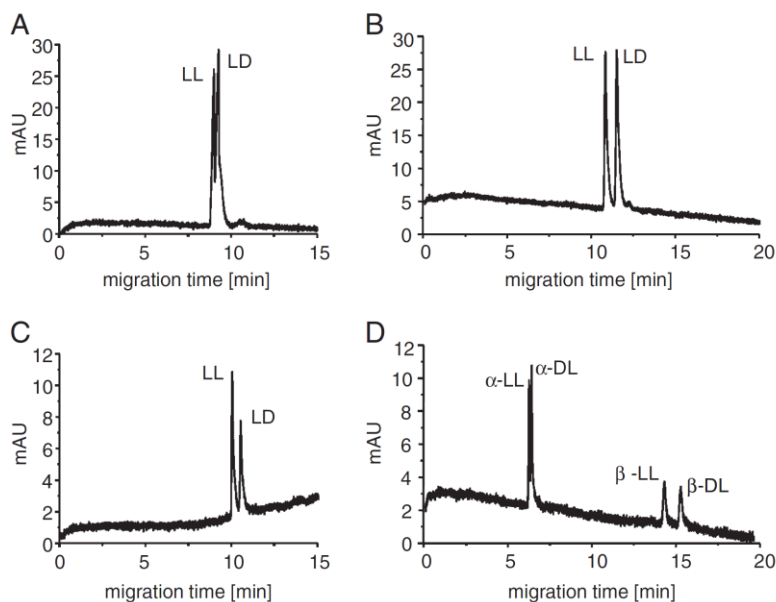


**Figure 2.** Plot of plate height versus migration velocity of Ala-Phe and Ala-Tyr. Experimental conditions are the same as in Fig. 1 except for the applied voltage.

### 3.2 Separation of diastereomers of dipeptides

The acidic mobile phase evaluated above also allowed the separation of diastereomers of dipeptides (Fig. 3). The LL stereoisomers of all peptides eluted before the LD or DL diastereomers, the  $\alpha$ -isomers of Asp-PheOMe eluted faster than the  $\beta$ -isomers. With the exception of  $\alpha$ -Asp-PheOMe the elution order can be explained based on the  $pK_a$  values of the peptide diastereomers. The  $pK_a$  values of di- and tripeptides range between 2.8 and 3.4 [13, 14] and the all-L stereoisomers of small peptides are typically less acidic than the diastereomers with “mixed” stereochemistry of the amino acids [15, 16]. Therefore, the DL stereoisomers bear a less positive charge at pH 3.0 resulting in a slower electrophoretic mobility compared with the respective LL configured peptides so that the LL diastereomers elute first. The same order has been observed for the diastereomers of Ala-Phe and  $\beta$ -Asp-PheOMe in CZE [17–19]. In contrast,  $\alpha$ -D-Asp-L-PheOMe is less acidic than  $\alpha$ -L-Asp-L-PheOMe [20] which is also reflected in the migration order DL isomer before LL diastereomer in CZE using a phosphate buffer, pH 2.7 as BGE [18, 19]. However, in CEC on the hydrophobic monolith the opposite elution order is observed which cannot be explained based on the  $pK_a$  values of the diastereomers. Thus, interaction with the stationary phase apparently slows down the velocity of  $\alpha$ -D-Asp-L-PheOMe so that the compound elutes after the LL stereoisomer.

The separation of the peptide diastereomers was studied as a function of the pH and concentration of the aqueous buffer as well as the content of the organic modifier ACN. Between pH 2.0 and 3.0, only a slight increase of the retention times were observed for the analytes as shown for the LL isomers of Ala-PheOH,  $\alpha$ -Asp-PheOMe and

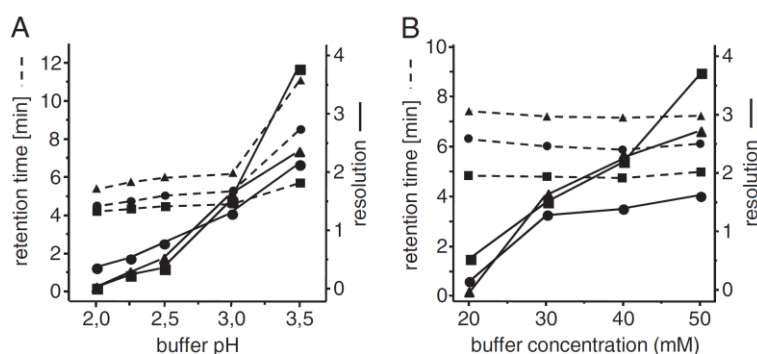


**Figure 3.** CEC separation of peptide diastereomers, (A) Ala-Ala, (B) Ala-Phe, (C) Leu-Leu and (D)  $\alpha/\beta$ -Asp-PheOMe. Experimental conditions: hydrophobic monolith 30 cm effective length (total length 37 cm)  $\times$  75  $\mu$ m capillary id. Other conditions are the same as in Fig. 1.

Phe- $\beta$ -Asp-GlyOH in Fig. 4A. Raising the pH to 3.5 led to a significant increase of the retention times. At pH 4.0 extremely long analysis times were observed. For example, a retention time of more than 20 min was found for  $\alpha$ -L-Asp-L-Phe-OMe at pH 4.0. This behavior can be explained by the deprotonation of the peptides with increasing pH resulting in zwitterionic, neutral analytes. As the EOF is negligible in the hydrophobic monolith the migration velocity is substantially reduced with increasing pH. Peak resolution generally increased with pH up to 3.5 (Fig. 4A). At 4.0 considerably peak broadening is observed reducing resolution. Buffer concentration in the range 20–50 mM at pH 3.0 did not significantly affect retention times (Fig. 4B). In contrast,  $R_S$  values increased with increasing concentrations

of the aqueous buffer. This may be due to the narrower peaks observed when increasing the buffer concentration. A neutral monolith displays a stronger hydrophobic retention of analytes and, thus, higher column efficiency when increasing buffer concentration of the mobile phase which resulted in the improved  $R_S$  values.

The effect of the concentration of ACN was studied using a 30 mM phosphate buffer, pH 3.0 as aqueous component and  $\alpha/\beta$ -D/L-Asp-L-PheOMe as analytes. The results are summarized in Table 1. Increasing the ACN concentration between 10 and 50% led to a general increase in migration velocity of the analytes and a concomitant increase in the resolution of the diastereomeric pairs. Wu *et al.* observed reduced retention

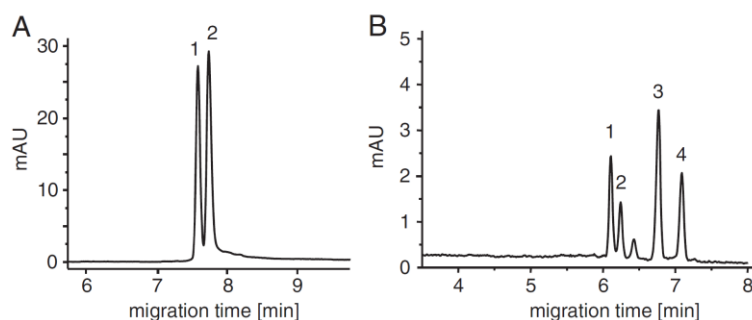


**Figure 4.** Effect of the (A) buffer pH and (B) buffer concentration on the separation of peptide diastereomers. Solid line: resolution, dashed line: retention time of the LL isomers. ( $\blacktriangle$ ) L-Phe- $\beta$ -L/b-Asp-Gly, ( $\bullet$ )  $\alpha$ -L/b-Asp-L-PheOMe, ( $\blacksquare$ ) L-Ala-L/b-Phe.

**Table 1.** Effect of ACN on electrophoretic mobility and resolution of  $\alpha/\beta$ -L/b-Asp-L-PheOMe<sup>a)</sup>

ACN % (v/v)	Electrophoretic mobility ( $\mu$ ) ( $\times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )				Resolution ( $R_S$ )	
	$\alpha$ -LL	$\alpha$ -DL	$\beta$ -LL	$\beta$ -DL	$\alpha$ -LL/ $\alpha$ -DL	$\beta$ -LL/ $\beta$ -DL
10	0.777	0.755	0.224	0.204	0.73	1.98
20	1.007	0.977	0.351	0.322	0.88	2.05
30	1.172	1.140	0.440	0.406	1.03	2.16
40	1.271	1.213	0.502	0.481	1.22	2.48
50	1.381	1.315	0.624	0.585	2.09	5.87

a) Experimental conditions: mobile phase, 30 mM phosphate buffer pH 3.0 with ACN concentration varied between 10 and 50% v/v. Other conditions are the same as in Fig. 1.



**Figure 5.** CEC separation of (A) tetracosactide and (B) Phe- $\alpha/\beta$ -Asp-Gly diastereomers. Experimental conditions: hydrophobic monolith 20 cm effective length (total length 27 cm)  $\times$  75  $\mu\text{m}$  capillary id; mobile phase: 30 mM phosphate buffer, pH 2.0, containing 40% v/v ACN; applied voltage: 12 kV; UV detection 214 nm. (A) (1)  $^{16}\text{F}$ [D-Lys]-tetracosactide, (2) tetracosactide; (B) (1) L-Phe- $\alpha$ -L-Asp-Gly, (2) L-Phe- $\alpha$ -D-Asp-Gly, (3) L-Phe- $\beta$ -L-Asp-Gly, (4) L-Phe- $\beta$ -D-Asp-Gly.

times of fast migrating peptides but longer elution times of slower migrating peptide analytes on the hydrophobic monolith with increasing ACN concentrations from 0 to 20% [10].

CEC on the hydrophobic monolith also allowed the separation of the diastereomers of the 24mer peptides tetra-cosactide and  $^{16}[\text{D-Lys}]$ -tetracosactide (Fig. 5A). Interestingly, the isomer containing D-Lys eluted faster than the all-L peptide. Moreover, the mixture of isomeric Asp tripeptides L-Phe-L/D- $\alpha$ / $\beta$ -Asp-GlyOH could be separated on the hydrophobic monolith using a phosphate buffer, pH 2.0, containing 40% ACN as the mobile phase (Fig. 5B). The separation of this mixture could not be completely achieved by either CZE [21, 22] or HPLC [12]. In CZE the  $\alpha$ -L/D-Asp diastereomers comigrated. Separation could only be achieved by the addition of carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin to the BGE [21, 22]. In contrast, the  $\alpha$ / $\beta$ -D-Asp isomers coeluted in HPLC analysis on a RP C-18 column. This example clearly illustrates that in addition to the electrophoretic mobility the chromatographic interaction of the peptide analytes with the hydrophobic monolith as the stationary phase contributed to their separation.

#### 4 Concluding remarks

A hydrophobic monolith obtained by copolymerization of lauryl methacrylate and ethylene dimethacrylate has been evaluated for the CEC separation of diastereomers of small peptides. Employing acidic mobile phases containing ACN as organic modifier the peptides were separated in RP mode. Under these conditions, the peptides migrated as charged compounds due to their own electrophoretic mobility. Interaction with the stationary phase contributed to their separation. This became evident comparing the elution order of  $\alpha$ -L/D-Asp-L-PheOMe in CEC with the migration order observed in CZE. While the order was  $\alpha$ -D-Asp-L-PheOMe before  $\alpha$ -L-Asp-L-PheOMe in CZE [19] a reversed order was observed by CEC using a hydrophobic monolith. Moreover, a mixture of isomeric Asp tripeptides that could not be completely separated by HPLC or CZE [12, 21, 22] was successfully resolved by CEC. These examples clearly illustrate that CEC offers additional separation mechanisms and may be superior to CZE or HPLC in certain cases.

The financial support by the Sino-German Center for Research Promotion (DFG and NSFC, Grant No. GZ 364) is gratefully acknowledged.

The authors have declared no conflict of interest.

#### 5 References

- [1] Kašička, V., *Electrophoresis* 2008, 29, 179–206.
- [2] Kašička, V., *Electrophoresis* 2006, 27, 142–175.
- [3] Mikšík, I., Sedláková, P., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1686–1703.
- [4] Popa, T. V., Mant, C. T., Hodges, R. S., *Electrophoresis* 2004, 25, 94–107.
- [5] Schmid, M. G., Grobuschek, N., Pessenhofer, V., Klostius, A., Gübitz, G., *Electrophoresis* 2003, 24, 2543–2549.
- [6] Wu, R., Hu, L., Wang, F., Ye, M., Zou, H., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 369–392.
- [7] Eeltink, S., Svec, F., *Electrophoresis* 2007, 28, 137–147.
- [8] Svec, F., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 729–745.
- [9] Svec, F., *Electrophoresis* 2009, 30, S68–S82.
- [10] Wu, R., Zou, H., Ye, M., Lei, Z., Ni, J., *Anal. Chem.* 2001, 73, 4919–4923.
- [11] Sabbah, S., Scriba, G. K. E., *J. Chromatogr. A* 2000, 894, 267–272.
- [12] De Boni, S., Oberthür, C., Hamburger, M., Scriba, G. K. E., *J. Chromatogr. A* 2004, 1022, 95–102.
- [13] Vallat, P., Gailard, P., Carrupt, P.-A., Tsai, R.-S., Testa, B., *Helv. Chim. Acta* 1995, 78, 471–485.
- [14] Ishimitsu, T., Sakurai, H., *Talanta* 1983, 30, 879–883.
- [15] Ellenbogen, E., *J. Am. Chem. Soc.* 1952, 74, 5198–5201.
- [16] Li, N. C., Miller, G. W., Solony, N., Gillis, B. T., *J. Am. Chem. Soc.* 1960, 82, 3737–3739.
- [17] Li, J., Waldron, K. C., *Electrophoresis* 1999, 20, 171–179.
- [18] Sabah, S., Scriba, G. K. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 16, 1089–1096.
- [19] Sabah, S., Scriba, G. K. E., *J. Microcol. Sep.* 1998, 10, 255–258.
- [20] Sabah, S., Ph.D. Thesis, University of Münster, 1998.
- [21] De Boni, S., Scriba, G. K. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 43, 49–56.
- [22] Conrad, U., Taichrib, A., Neusüß, C., Scriba, G. K. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 51, 640–648.

## Manuskript 2

### **A weak cation-exchange monolith as stationary phase for the separation of peptide diastereomers by capillary electrochromatography**

Ronny Ludewig, Sandor Nietzsche, Gerhard K. E. Scriba.

*Journal of Separation Science* **2010**, eingereicht.

Gegenstand dieses Manuskripts war die Entwicklung eines hydrophilen Monolithen, welcher auf seine Trenneffizienz von isomeren Aspartyl-Peptiden unter Verwendung der Kapillarelektrochromatographie untersucht wurde. Für die Monolith-Kapillaren wurde 4-Acrylamidobuttersäure in Kombination mit Acrylamid und Methylenbisacrylamid als Quervernetzer umgesetzt. Unterschiedliche Anteile an Porogen führten zu Veränderungen in der Trennung von Aspartyl-Peptiden. Der Einfluss der Zusammensetzung der mobilen Phase auf die analytische Trennung von diastereomeren Peptiden wurde untersucht und optimiert.

**Eigenanteil:** Synthese des WCX-Monomers, Entwicklung der Monomermischungen und Herstellung von Monolith-Kapillaren, Auswahl der diastereomeren Peptide, Optimierung der Trennungen durch Veränderungen in der mobilen Phase, Auswertung der Daten und Elektronenmikroskopaufnahmen, Erstellen des Manuskripts.



---

**A weak cation-exchange monolith as stationary phase for the separation of peptide diastereomers by capillary electrochromatography**

Ronny Ludewig<sup>1</sup>, Sandor Nietzsche<sup>2</sup>, Gerhard K.E. Scriba<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Friedrich Schiller University, Jena, Germany

<sup>2</sup> Center of Electron Microscopy, Friedrich-Schiller University, Jena, Germany

**Correspondence**

Professor Gerhard K.E. Scriba

Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry

University of Jena

Philosophenweg 14

07743 Jena, Germany

**Email:**       gerhard.scriba@uni-jena.de

**Fax:**         +49-3641-949802

**Keywords:** Capillary Electrochromatography / Weak Cation-Exchange / Monolithic Column / Scanning Electron Microscopy / Peptide Diastereomers

---

**Abstract**

A CEC weak cation-exchange monolith has been prepared by in situ polymerization of acrylamide, methylenebisacrylamide and 4-acrylamidobutyric acid in a decanol-dimethylsulfoxide mixture as porogen. The columns were evaluated by scanning electron microscopy and characterized with regard to the separation of diastereomers and  $\alpha/\beta$ -isomers of aspartyl peptides. Column preparation was reproducible as evidenced by comparison of the analyte retention times of several columns prepared simultaneously. Analyte separation was achieved using mobile phases consisting of acidic phosphate buffer and acetonitrile. Under these conditions the peptides migrated due to their electrophoretic mobility but the EOF also contributed as driving force as a function of the pH of the mobile phase due to increasing dissociation of the carboxyl groups of the polymer. Raising the pH of the mobile phase also results in deprotonation of the peptides reducing analyte mobility. Due to these mechanisms each pair of diastereomeric peptides displayed the highest resolution at a different pH of the buffer component of the mobile phase. Comparing the weak cation exchange monolith to a reversed phase monolith and a strong cation-exchange monolith different elution order of some peptide diastereomers was observed clearly illustrating that interactions with the stationary phase contribute the CEC separations.

## 1 Introduction

Peptides are an important class of compounds with a variety of physiological functions. With regard to their analysis essentially all separation techniques have applied including capillary electrochromatography (CEC) as summarized in several recent reviews [1-3]. CEC offers the advantage of the low dispersion of EOF-driven systems and the high selectivity of chromatographic phases. Open-tubular columns, columns packed with particulate stationary phases as well as monolithic organic or inorganic columns have been used in CEC. Especially the organic monoliths offer a variety of chemistries and functionalization [4-8]. They can be prepared easily and are not limited by problems regarding frit fabrication and column packing. Acrylamide- and acrylate-based monoliths are often used as this strategy allows the preparation of neutral or charged columns [3-5,7,8]. The monoliths are usually prepared by free radical polymerization of monomers and crosslinkers in a capillary with a suitable surface modification allowing the covalent attachment of the polymer to the capillary. The polymerization is initiated by heat, UV or gamma radiation, or redox reagents [8].

With regard to CEC peptide separations, mostly separations of peptides composed of natural L-configured amino acids have been published as summarized in [1-3]. Only few studies considered peptide stereoisomers. Comparing the separation of helical 18mer peptide diastereomers by capillary zone electrophoresis (CZE), micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and CEC, Popa et al. noted higher resolution for most peptide diastereomers by CEC employing a C8-coated capillary in the presence of 25% 2,2,2-trifluoroethanol or 25% ethanol compared with CZE or MEKC in bare fused-silica capillaries [9]. Schmid and coworkers separated the diastereomers and enantiomers of di- and tripeptides possessing one or two chiral centers on a capillary packed with a teicoplanin stationary phase [10]. Recently, a hydrophobic reversed phase (RP) monolith obtained by copolymerization of lauryl methacrylate and ethylene dimethacrylate was

shown to effectively separate positional isomers and diastereomers of short aspartyl peptides using a mobile phase composed of phosphate buffer, pH 2 - 3, and 40% (v/v) acetonitrile [11]. Under these conditions the peptides migrated as positively charged analytes and interaction with the stationary phase contributed to their separation.

A cation exchange mechanism may also be considered for peptide CEC separations. CEC peptide analysis is typically performed using a RP [7,11] or a strong cation exchange (SCX) monolith [12, 13] although the use of a weak cation-exchange (WCX) monolith has been reported for peptide LC separations [14, 15]. To the best of our knowledge peptide CEC separations on a WCX monolithic column have not been reported to date. Therefore, the present study was conducted in order to evaluate the potential of a WCX monolith obtained from copolymerization of 4-acrylamidobutyric acid, acrylamide and methylenebisacrylamide for the separation of diastereomeric peptides.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Chemicals**

Acrylamide, methylenebisacrylamide,  $\gamma$ -methacryloxypropyltrimethoxysilane ( $\gamma$ -MAPS) and azobisisobutyronitrile (AIBN) were purchased from the Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, Germany), 4-aminobutyric acid was from Acros Organics (Geel, Belgium), and dimethylsulfoxide (DMSO), decanol, HPLC grade acetonitrile, methanol and acryloyl chloride were from VWR International (Darmstadt, Germany). 4-Acrylamidobutyric acid was synthesized according to Camail et al. [16]. The diastereomers L/D-Ala-L-Phe were purchased from Bachem AG (Heidelberg, Germany) while the isomers and diastereomers  $\alpha/\beta$ -D/L-Asp-L-PheOMe, L-Phe- $\alpha/\beta$ -D/L-Asp-GlyOH and L-Phe- $\alpha/\beta$ -D/L-Asp-GlyNH<sub>2</sub> were synthesized according to [17, 18]. All other chemicals were obtained from commercial sources at the highest purity available. Buffers and solutions were prepared in deionized, double distilled water, filtered (0.2  $\mu$ m) and degassed by sonication.

## 2.2 Preparation of monolithic columns

Fused-silica capillaries were pretreated by rinsing with 0.1 M NaOH for 1 h and water until the effluent reached pH 7.0. After flushing with methanol for 10 min, the capillaries were dried with nitrogen gas. They were subsequently filled with a 1:1 (v/v) solution of  $\gamma$ -MAPS in methanol, sealed at both ends with rubber and submerged in a water bath of 45°C overnight. Finally, the capillaries were rinsed with methanol and water. 40 mg acrylamide, 40 mg methylenebisacrylamide, 12 mg 4-acrylamidobutyric acid and 2 mg AIBN were added to a defined amount of a 25:19 (v/v) mixture of decanol and DMSO (typically 440  $\mu$ L). The mixture was sonicated for 20 min, purged with nitrogen for 10 min and filled into the capillary by a manual syringe. The ends of the capillary were sealed with rubber and the capillary was submerged in a 60°C water bath for 24 h. The resulting monolithic capillary column was washed with methanol for about 2 h using a HPLC pump to remove unreacted monomers and porogens. The detection window was made by burning off 1-2 mm of the outer polyimide layer. The ashes of the organic monolith in the column were flushed out with methanol for 30 min with a HPLC pump. The column was flushed and equilibrated with the mobile phase at 12 kV for 30 min before running samples. The total lengths of the capillary columns were 27 cm, while the effective length was 20 cm.

## 2.3 Instrumentation and chromatographic conditions

All experiments were carried out on a Beckman P/ACE 5510 instrument (Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Fused-silica capillaries (75  $\mu$ m id, 375  $\mu$ m od) were obtained from BGB Analytik (Schlossbröckelheim, Germany). A LC-6A HPLC pump (Shimadzu, Duisburg, Germany) and a manual syringe pump (Unimicro Technologies Inc., CA, USA) were used to flush the capillary columns. The mobile phases were prepared by mixing aqueous phosphoric acid and acetonitrile (ACN). The pH was subsequently adjusted using

diluted NaOH solution. The monolithic capillary was placed in the cartridge and flushed for about 20 min with the mobile phase using a manual syringe pump. Subsequently, the capillary was placed in the instrument and equilibrated with the mobile phase by applying a voltage of 12 kV until a stable baseline was obtained. Samples were injected electrokinetically at 1 to 10 kV. CEC experiments were carried out at a temperature of 25°C, the detection wavelength was 214 nm.

## **2.4 Scanning electron microscopy**

For preparation of the scanning electron microscopy (SEM) capillaries were glued vertically onto SEM stubs using an electrically conductive adhesive (Leit-C, Plano GmbH, Wetzlar, Germany). The capillaries were then sputter coated with gold (thickness approx. 10 nm) using a SCD005 sputter coater (BAL-TEC, Liechtenstein) to prevent surface charging. Finally, the samples were investigated with a field emission (FE) SEM LEO-1530 Gemini (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Germany) at an electron energy of 8 keV using the in-lens secondary electron detector.

## **3 Results and discussion**

### **3.1 Column preparation and characterization**

The preparation of the WCX monolith followed the method described by Dong et al. for the synthesis of a SCX monolith [12] using a 25:19 (v/v) mixture of decanol and DMSO as porogenic solvent. The amount of the porogen was varied at 330  $\mu$ L (column 1), 440  $\mu$ L (column 2) and 550  $\mu$ L (column 3) keeping the amount and composition of the monomers constant. The resulting monoliths were studied by SEM (Fig. 1). It can be clearly seen that continuous beds with macropores were formed and that an increasing amount of porogen led to larger pores. Subsequently, the chromatographic behavior of the monoliths was evaluated using a mobile phase consisting of a 20 mM phosphate buffer,

pH 2.0, containing 60% (v/v) ACN. The mixture of isomeric and diastereomeric Asp peptides, L-Phe- $\alpha/\beta$ -D/L-Asp-GlyNH<sub>2</sub> was used as test analytes. Increasing the macropores, i.e. the amount of the porogenic system, resulted in a faster separation of the peptides but reduced plate numbers and slightly increasing peak tailing was also observed. For the tested peptides plate numbers between 110,000 and 170,000 were observed for column 1, plate numbers between 140,000 and 180,000 for column 2 and plate numbers between 100,000 and 155,000 for column 3. Nevertheless all 4 peptides could be successfully separated regardless of the size of the macropores.

The dependence of the EOF on the pH of the mobile phase was studied for column 2 between pH 2.0 and 5.0 using a 4:6 (v/v) mixture of 20 mM phosphate buffer and ACN. The EOF increased with increasing pH leveling off at pH values above 4 (Fig. 2). 4-Aminobutyric acid has a pK<sub>a</sub> of 4.23 [19] but the actual pK<sub>a</sub> values of the carboxylic acid groups in the polymer are unknown. However, the increasing EOF demonstrates that deprotonation of the acid functions increases when increasing the pH of the mobile phase. Above pH 4 most carboxyl groups appear to be ionized resulting in a stable EOF.

Overall, the EOF of the WCX monolith is weaker compared to the EOF of about  $1.65 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  reported for a SCX monolith containing sulfonated groups which was synthesized from a comparable reaction mixture where 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid was included instead of 4-aminobutyric acid [12].

The run-to-run reproducibility of CEC separations was evaluated for column 2 using L-Phe- $\alpha/\beta$ -D/L-Asp-GlyNH<sub>2</sub> and L-Phe- $\alpha/\beta$ -D/L-Asp-GlyOH as analytes and a 20 mM phosphate buffer, pH 2.0, containing 60% (v/v) ACN as mobile phase. Intraday precision was determined by 6 repeated injections on the same day, interday precision was assessed by analyzing the samples in triplicate on 3 consecutive days. The retention times of the peptide isomers and the respective RSD values are summarized in Table 1. Intraday precision was better than 0.70% while interday precision ranged between 0.59% and

1.15%. These values are in the range of RSD data reported for other acrylamide-based monoliths [20, 21]. Furthermore, the reproducibility of the polymerization process was studied by comparison of 6 monolithic columns prepared from the same monomer solution (intercolumn precision). Values better than 5% were observed (Table 1) which are comparable to data reported in the literature for acrylate-based [15, 22, 23] and acrylamide-based monoliths [21].

### 3.2. Effect of mobile phase composition

The separation of the Asp peptide isomers and diastereomers was studied as a function of the content of the organic modifier ACN as well as the pH and concentration of the aqueous buffer as well as using column 2. Increasing the amount of ACN from 40% to 70% (v/v) in a 20 mM phosphate buffer, pH 2.0, resulted in shorter retention times and improved peak symmetry while peak resolution was not significantly affected. A concentration of 70% (v/v) ACN resulted in unstable currents and current breakdown so that a content of 60% (v/v) ACN was used in subsequent experiments.

The dependence of the resolution of diastereomers of L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub> and L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH on the concentration of a phosphate buffer, pH 2.0, containing 60% (v/v) ACN was studied in the range between 15 and 30 mM. A slight increase of the retention times with increasing buffer concentrations was found (data not shown). The effect of the buffer concentration on peak resolution of the diastereomers is summarized in Fig. 3. The highest resolution was observed at 20 mM. This is in contrast to the separation of the diastereomers of the Asp peptides on a neutral RP monolith where steadily increasing resolutions was observed when raising buffer concentration from 20 to 50 mM [11]. Subsequently, 20 mM phosphate buffer was used in further experiments.

The effect of the pH of a 20 mM phosphate buffer was studied between pH 2.0 and 4.0 at an ACN concentration of 60% (v/v). Generally, retention times increased with increasing



pH values. This may be attributed to the protonation equilibria of the stationary phase and the peptide analytes. The  $pK_a$  values of the peptide analytes range between 2.2 and 3.8 [24-26]. Moreover, all-L stereoisomers of small peptides are typically less acidic than the diastereomers with "mixed" stereochemistry of the amino acids [27, 28]. Thus, the peptides are positively charged at pH 2-3 while they become increasingly electroneutral zwitterions when increasing the pH of the mobile phase, thus, reducing their electrophoretic mobility. The  $\beta$ -Asp peptides generally migrate slower than the corresponding  $\alpha$ -isomers due to their higher acidity. On the other hand, the negative charge of the monolith increases with pH as illustrated by the increasing EOF (Fig. 2). This may result in different interactions between the stationary phase and the peptide analytes depending on the pH. As a consequence, there is no optimum pH for the separation of all peptides as can be concluded from the resolution of the diastereomers of L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub>, L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH and  $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-L-PheOMe as a function of buffer pH summarized in Table 2. The highest  $R_S$  values were found at pH 2.5 in the case of L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH, at pH 3.0 for L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub> while no common pH optimum existed in the case of  $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-L-PheOMe. The  $\alpha$ -isomers were best resolved at pH 3.5 while the optimum for the  $\beta$ -isomers was found at pH 2.0.

### 3.3 Comparison of WCX separation to SCX and RP monoliths

The CEC separation of D/L-Ala-L-PheOH and L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH on the WCX monolith was compared to the elution behavior on a RP monolith prepared by polymerization of lauryl methacrylate [11, 29] and a strong SCX monolith based on 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid [12]. Fig. 4 summarizes the separations using a 20 mM phosphate buffer, pH 2.0, containing 40% (v/v) ACN as mobile phase.

This electrolyte was selected because 60% ACN led to instable currents when using the RP monolith. While separations of D/L-Ala-L-PheOH were observed using all 3 types of monoliths, L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH could only be analyzed on the WCX and RP monolith. The analytes were not detected within 60 min on the SCX column presumably due to strong electrostatic interactions between the positively charged peptides and the negatively charged stationary phase. In the case of D/L-Ala-L-PheOH the WCX and RP monoliths gave comparable isomer separations with regard to peak resolution and analysis time (Fig. 4A and 4B), while especially considerably longer retention times were found for the SCX monolith (Fig. 4C). This may be explained by stronger interactions of the positively charged peptides with the negatively charged SCX monolith compared to the uncharged RP column and the only slightly negatively charged WCX monolith using the pH 2.0 buffer component. Moreover, the elution order of Ala-PheOH is reversed with the D/L-diastereomer eluting first when using the SCX column.

The separation of the L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH isomers was comparable on both monoliths. However, opposite elution order was observed for the  $\alpha$ -Asp diastereomers with the LL-stereoisomer eluting faster on the RP monolith (Fig. 4D) while the LD-epimer eluted faster on the WCX column (Fig. 4E). Moreover, it is interesting to note that the diastereomers L-Phe- $\alpha$ -L/D-Asp-GlyOH could not be separated by CZE [18, 30]. This clearly illustrates the fact that the CEC separation is not only based on electrophoretic migration of the analytes but that chromatographic interactions with the stationary phase contributed to the separation. The fact that the separation is not solely based on a chromatographic principle can be concluded from the observation that the  $\alpha/\beta$ -D-Asp isomers coeluted on a RP-18 column in HPLC [18].

#### 4. Conclusions

A WCX monolith was synthesized by copolymerization of 4-acrylamidobutyric acid, acrylamide and methylenebisacrylamide in the presence of decanol/DMSO as porogen. Using acidic mobile phases containing ACN as organic modifiers the peptides migrated due to their electrophoretic mobility as charged compounds. Raising the pH of the buffer component resulted in lower mobility due to the deprotonation of the peptides. On the other hand, upon increasing the pH of the mobile phase the magnitude of the EOF increased caused by the deprotonation of the carboxylic acid groups, thus, contributing also to the elution of the analytes. As a consequence no optimum pH was found for the diastereomer separation of all Asp peptides due to the interplay of analyte and stationary phase deprotonation. Interaction with the stationary phase contributed to the peptide separations. This became evident comparing the elution order of the peptides on different types monolithic columns in CEC. Furthermore, the separation of all isomers of L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH, which could not be achieved either by CZE or HPLC [18, 30], could be observed using either the RP monolith or the WCX monolith. The example illustrates that CEC offers additional selectivities and separation mechanisms and may be superior to CZE and HPLC in some cases.

#### Acknowledgments

The authors thank Susanne Linde for her expert assistance in preparation and operation of the scanning electron microscope and Dr. Jing Dong and Prof. Dr. Hanfa Zou for helpful discussions.

## 5. References

- [1] Mikšik, I., Sedlakova P., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1686-1703.
- [2] Kašicka, V., *Electrophoresis* 2008, 29, 179-206.
- [3] Kašicka, V., *Electrophoresis* 2010, 31, 122-146.
- [4] Vlakh, E. G., Tennikova, T. B., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 2801-2813.
- [5] Svec, F., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 729-745.
- [6] Svec, F., *Electrophoresis* 2009, 30, S68-S82.
- [7] Wu, R., Hu, L., Wang, F., Ye, M., Zou, H., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 369-392.
- [8] Urban, J., Jandera, P., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 2521-2540.
- [9] Popa, T.V., Mant, C.T., Hodges, R.S., *Electrophoresis*, 2004, 25, 94-107.
- [10] Schmid, M.G., Grobuschek, N., Pessenhofer, V., Klostius, A., Gübitz, G., *Electrophoresis*, 2003, 24, 2543-2549.
- [11] Ludewig, R., Dong, J., Zou, H., Scriba, G. K. E., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1085-1089.
- [12] Dong, J., Ou, J., Dong, X., Wu, R., Ye, M., Zou, H., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 2986-2992.
- [13] Huang, H. Y., Lin, H. Y., Lin, S. P., *Electrophoresis* 2006, 27, 4674-4681.
- [14] Krenkova, J., Gargano, A., Lacher, N. A., Schneiderheinze, J. M., Svec, F., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 6824-2830.
- [15] Chen, X., Tolley, H. D., Lee, M. L., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 3844-3854.
- [16] Camail, M., Maesano, J. C., Margaillan, A., Vernet, J. L., *Macromol. Chem. Phys.* 1995, 196, 167-175.
- [17] Sabah, S., Scriba, G. K. E., *J. Chromatogr. A* 1998, 822, 137-145.
- [18] De Boni, S., Oberthür, C., Hamburger, M., Scriba, G. K. E., *J. Chromatogr. A* 2004, 1022, 95-102.
- [19] Neuberger, A., *Proc. R. Soc. A* 1937, 158, 68-96.
- [20] Koide, T., Ueno, K., *J. High Res. Chromatogr.* 2000, 23, 59-66.

- 
- [21] Hoegger, D., Freitag, R., *J. Chromatogr. A* 2001, *914*, 211-222.
- [22] Gu, C., He, J., Jia, J., Fang, N., Shamsi, S. A., *Electrophoresis* 2009, *30*, 3814-3827.
- [23] Svec, F., Peters, E. C., Sykora, D., Yu, C., Frechet, J. M. J., *J. High Res. Chromatogr.* 2000, *23*, 3-18.
- [24] Sabah, S., Scriba, G. K. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, *16*, 1089-1096.
- [25] Sabah, S., Stereoisomerentrennung von Aspartyl- und Isoaspartyl-Peptiden mit der Kapillarelektrophorese, Ph.D. Thesis, Münster, 1998.
- [26] Vallat, P., Gaillard, P., Carrupt, P.-A., Tsai, R.-S., Testa, B., *Helv. Chim. Acta* 1995, *78*, 471-485.
- [27] Ellenbogen, E., *J. Am. Chem. Soc.* 1952, *74*, 5198-5201.
- [28] Li, N. C., Miller, G. W., Solony, N., Gillis, B. T., *J. Am. Chem. Soc.* 1960, *82*, 3737-3739.
- [29] Wu, R., Zou, H., Ye, M., Lei, Z., Ni, J., *Anal. Chem.* 2001, *73*, 4918-4923.
- [30] Conrad, U., Taichrib, A., Neusüß, C., Scriba, G. K. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, *51*, 640-648.

**Table 1** Intraday, interday and intercolumn retention times,  $t_R$ , and precision of L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub> and L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH.

	Phe-Asp-GlyNH <sub>2</sub>				Phe-Asp-GlyOH			
	$\alpha$ -LD	$\alpha$ -LL	$\beta$ -LL	$\beta$ -LD	$\alpha$ -LD	$\alpha$ -LL	$\beta$ -LL	$\beta$ -LD
$t_R$ intraday [min] (n = 6)	5.28	5.59	5.95	6.94	5.41	5.67	6.22	6.68
RSD [%]	0.34	0.35	0.09	0.18	0.59	0.66	0.58	0.69
$t_R$ interday [min] (n = 3)	5.30	5.61	5.98	6.99	5.46	5.72	6.27	6.74
RSD [%]	0.59	0.65	0.81	0.91	1.15	1.07	1.02	1.12
$t_R$ intercolumn [min] (n = 6)	5.43	5.65	6.07	7.10	5.43	5.77	6.49	6.57
RSD [%]	3.27	3.07	2.93	2.58	3.88	4.07	4.30	4.91

**Table 2** Resolution,  $R_S$ , of  $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-L-PheOMe, L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub> and L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH diastereomers as a function of the pH of the mobile phase buffer.

pH	Resolution					
	Asp-PheOMe		Phe-Asp-GlyNH <sub>2</sub>		Phe-Asp-GlyOH	
	$\alpha$ LL/ $\alpha$ DL	$\beta$ LL/ $\beta$ DL	$\alpha$ LL/ $\alpha$ LD	$\beta$ LL/ $\beta$ LD	$\alpha$ LL/ $\alpha$ LD	$\beta$ LL/ $\beta$ LD
2.0	0.86	2.68	2.36	5.13	1.62	2.22
2.5	1.12	1.11	3.12	8.27	5.66	4.69
3.0	1.53	0.82	6.25	9.67	1.40	1.90
3.5	1.95	n.s.	5.37	6.81	n.s.	n.s.
4.0	1.06	n.s.	4.89	3.26	n.s.	n.s.

n.s., not separated

**Figure legends**

**Figure 1** Scanning electron micrographs of the WCX monolithic column 1 (A), column 2 (B) and column 3 (C) and the separation of L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub>.

A1, B1 and C1 are the center section of the monoliths, A2, B2 and C2 are the edge section of the monoliths. A3, B3 and C3 show electrochromatograms of the CEC separation. Experimental conditions: 75  $\mu$ m id, 375  $\mu$ m od capillaries, 20 cm effective length, 27 cm total length; 20 mM phosphate buffer, pH 2.0, containing 60% (v/v) acetonitrile; 12 kV; 214 nm.

**Figure 2** Velocity of the EOF as a function of the buffer pH. Experimental conditions: 75  $\mu$ m id, 375  $\mu$ m od capillaries, 20 cm effective length, 27 cm total length; 20 mM phosphate buffer, containing 60% (v/v) acetonitrile.

**Figure 3** Resolution ( $R_s$ ) of the peptide diastereomers as a function of the buffer concentration. ■, L-Phe- $\alpha$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub>; □, L-Phe- $\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub>; ●, L-Phe- $\alpha$ -L/D-Asp-GlyOH; ○, L-Phe- $\beta$ -L/D-Asp-GlyOH.  
For experimental conditions see Fig. 1.

**Figure 4** CEC separation of L/D-Ala-L-PheOH (A - C) and L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH (D, E) on the RP monolith (A, D), the WCX monolith (B, E) and the SCX monolith (C). Experimental conditions: 75  $\mu$ m id, 375  $\mu$ m od capillaries, 20 cm effective length, 27 cm total length; 20 mM phosphate buffer, pH 2.0, containing 40% (v/v) acetonitrile; 12 kV; 214 nm. x, unknown synthetic impurity.



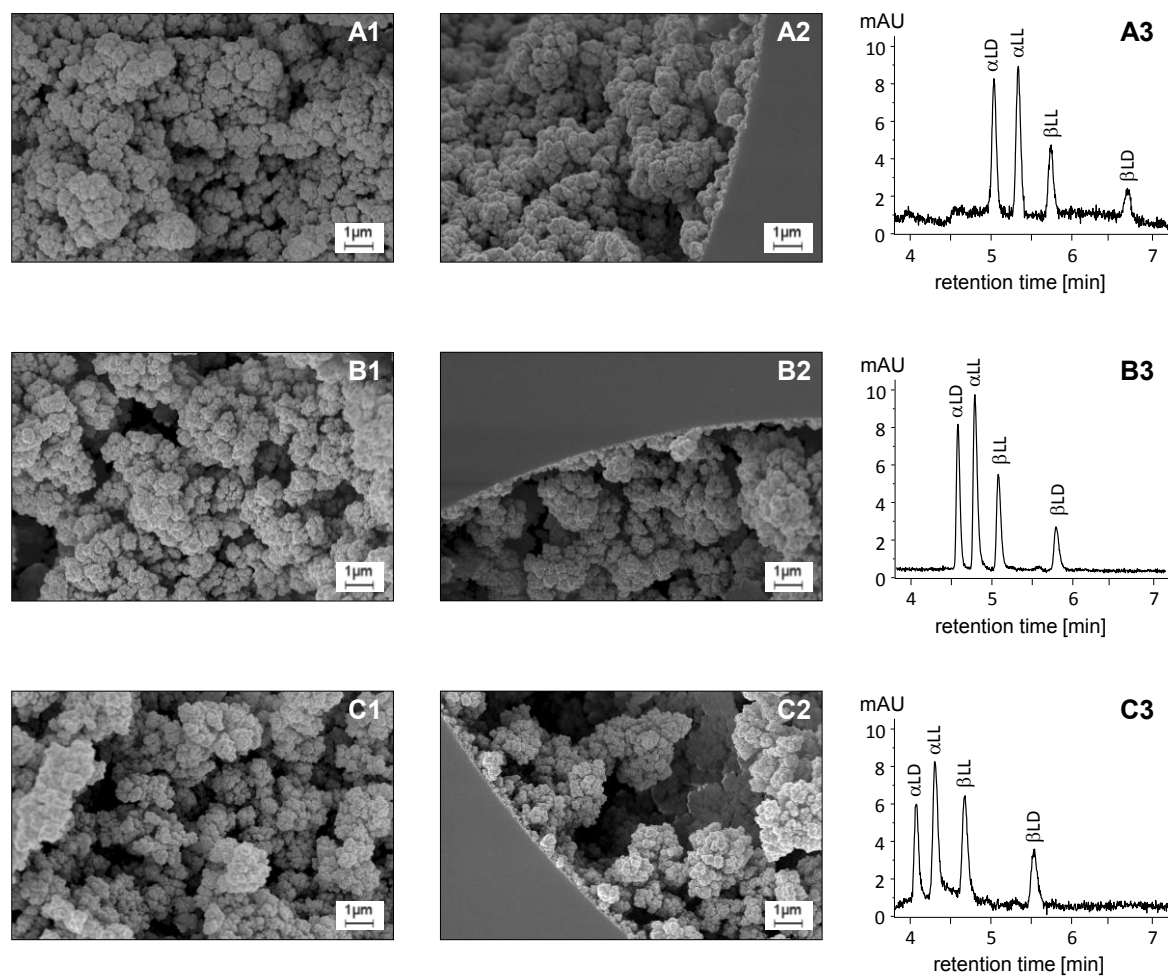


Figure 1

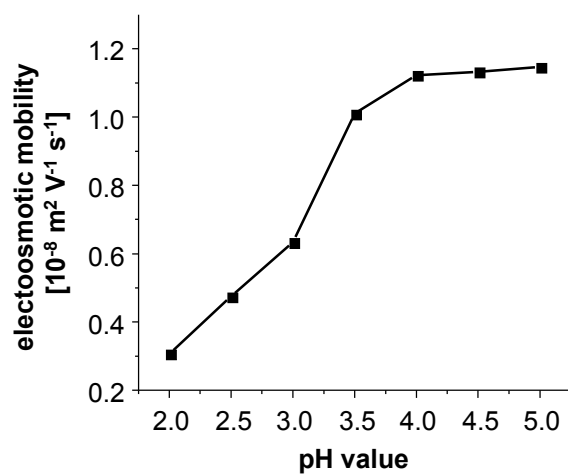


Figure 2

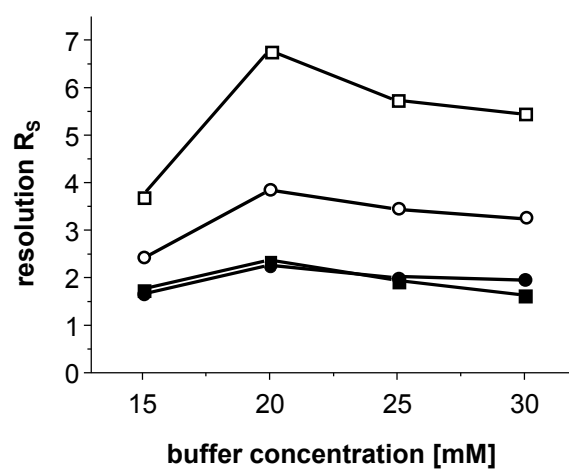


Figure 3

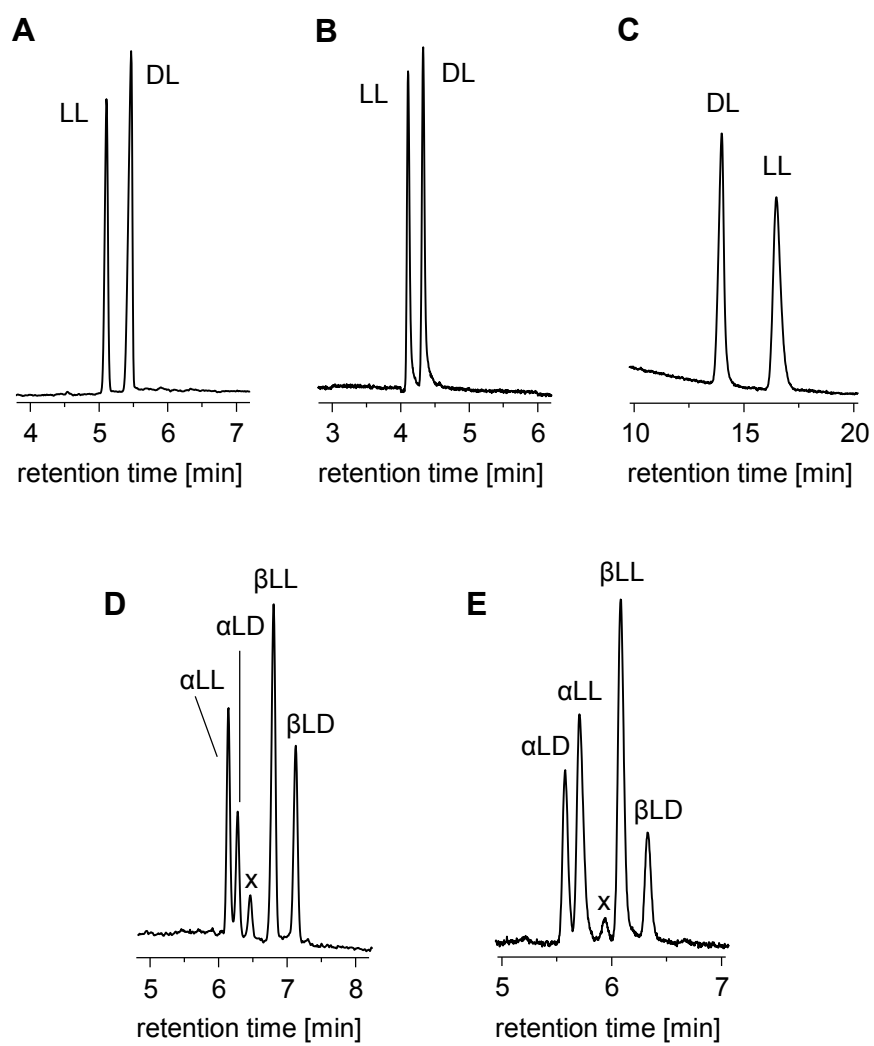


Figure 4

## Manuskript 3

### Development of a capillary electrophoresis-based assay of sirtuin enzymes

Yi Fan, Ronny Ludewig, Diana Imhof, Gerhard K. E. Scriba.

*Electrophoresis* **2008**, 29, 3717 - 3723.

Dieses Manuskript befasst sich mit der Entwicklung neuer Modellsubstanzen für einen Sirtuin-Enzym-Assay durch Festphasenpeptidsynthese. Alle Peptide enthalten Lysin, resp. N-ε-Acetyl-Lysin. Zur Erhöhung der Detektionsempfindlichkeit wurde bei der Synthese auf die Abspaltung der Fmoc-Gruppen am N-Terminus verzichtet. Die Trennung der acetylierten und nicht-acetylierten Peptide sowie Nicotinamid, welches Nebenprodukt der Enzymreaktion ist, wurde mittels Kapillarelektrophorese untersucht, optimiert und die analytische Methode für einen pre-column Assay validiert.

**Eigenanteil:** Synthese der peptidischen Modellsubstanzen, Methodenentwicklung und Validierung der Trennung der Fmoc-Peptide mittels CZE, Mitwirkung an der Erstellung des Manuskripts.

# Fast Track

Yi Fan<sup>1</sup>  
Ronny Ludewig<sup>1</sup>  
Diana Imhof<sup>2</sup>  
Gerhard K. E. Scriba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Jena, Jena, Germany

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Jena, Jena, Germany

Received June 6, 2008

Revised July 3, 2008

Accepted July 4, 2008

## Development of a capillary electrophoresis-based assay of sirtuin enzymes

Sirtuins are a family of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>)-dependent enzymes catalyzing the deacetylation of acetyl-lysine residues of histones and other proteins. Three 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-labeled peptide substrates derived from the amino acid sequence of p53, *i.e.* Fmoc-KK(Ac)-NH<sub>2</sub>, Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub> and Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub>, were synthesized and evaluated as substrates of the human isoenzyme SIRT1. The acetylated and respective deacetylated peptides as well as nicotinamide as the reaction product of nicotinamide adenine dinucleotide were separated by capillary electrophoresis in a fused-silica capillary using 200 mM phosphate-Tris buffer, pH 2.7. Sodium hydroxide-mediated sample stacking was performed in order to overcome peak asymmetry due to the high salt and acid content of the sample as well as to enhance UV detection sensitivity. The assay was subsequently validated. Upon incubation of the acetylated peptides for 60 min in the presence of 2.5 U of SIRT1 at least 87% of the peptides was deacetylated, indicating that the new derivatives are efficient substrates of the enzyme.

### Keywords:

Capillary electrophoresis / Deacetylation / Peptides / Sample stacking / Sirtuin  
DOI 10.1002/elps.200800361

## 1 Introduction

Sirtuins, also called class III histone deacetylases, are a family of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>)-dependent enzymes catalyzing the deacetylation of acetyl-lysine residues of histones and other proteins. The acetyl group is transferred to the cofactor NAD<sup>+</sup>, which is cleaved in this process to yield nicotinamide and 2'-O-acetyl-ADP-ribose [1]. The name of the group of enzymes is derived from the first member, silent information regulator 2 (Sir2) discovered in yeast. In humans seven sirtuin enzymes are known, SIRT1 to SIRT7, which have diverse cellular locations, target multiple substrates and affect a broad range of cellular functions, ranging from DNA repair to metabolism [2, 3]. Sirtuins appear to be involved in various diseases especially age-related diseases such as type-II diabetes, Alzheimer's disease and Parkinson's disease [4] making sirtuins attractive targets for drug discovery and development.

Several assays have been performed for the determination of the activity of sirtuin enzymes. For example, tradi-

tional methods utilized <sup>3</sup>[H]-acetylated peptides monitoring the release of radioactive acetate [1, 5–7]. Alternatively, the release of <sup>14</sup>[C]-nicotinamide or <sup>32</sup>[P]-nicotinamide from <sup>14</sup>[C]-NAD<sup>+</sup> or <sup>32</sup>[P]-NAD<sup>+</sup>, respectively, can be measured by HPLC [8, 9]. Although sensitive these assays have the drawback of health hazards and management of radioactive waste. A popular assay method is the commercially available *Fluor de Lys*<sup>TM</sup> fluorogenic assay, which employs an acetylated tetrapeptide labeled with 7-amino-4-methylcoumarin at the C-terminus. Upon deacetylation the peptide becomes a substrate for trypsin releasing the fluorophore, which results in an increase in fluorescence [10–12]. A similar principle underlies the Z-MAL substrate developed by Jung's group [13, 14]. A fluorescence-resonance-energy-transfer-based assay with peptide substrates containing 18–19 amino acid residues and a fluorophore at the C-terminus and a quencher at the N-terminus has been developed by Marcotte *et al.* [15]. Another approach is the HPLC separation of acetyl peptides and the respective deacetylated peptides following the enzyme reaction [1, 9, 16]. Recently, a microfluidic mobility shift assay has been reported utilizing 22mer or 23mer fluorescein-labeled peptides and Caliper's sipper chips including specific coating reagents [17]. Finally, a bioluminescence assay based on a series of enzymatic reactions including luciferase has been reported [17]. Although each of these assays has its advantages and disadvantages, most of them require either large peptides substrates that are difficult to synthesize, additional enzymatic steps for the detection of the deacetylation reaction, or specific equipment.

**Correspondence:** Professor Gerhard K. E. Scriba, School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Jena, Philosophenweg 14, D-7743 Jena, Germany  
**E-mail:** gerhard.scriba@uni-jena.de  
**Fax:** +49-3641-949802

**Abbreviation:** NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adenine dinucleotide

CE as a fast and highly efficient separation technique, which requires only small amounts of samples, has also been employed for the analysis and kinetic characterization of various enzymes [18, 19]. Therefore, the aim of the present study is the development of a CE-based sirtuin assay that can be performed with standard CE equipment without additional enzymatic cleavage steps employing easy to synthesize and, therefore, inexpensive substrates. Dipeptide to tetrapeptide derivatives based on the amino acid sequence 379–383 of p53, a known target site for human SIRT1 [20], were selected as substrates.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemicals

Fmoc-protected amino acids were purchased from Bachem AG (Heidelberg, Germany). Human recombinant SIRT1 was purchased from Biomol GmbH (Hamburg, Germany). Nicotinamide and  $\text{NAD}^+$  were from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany); tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), trichloroacetic acid (TCA) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from VWR International (Darmstadt, Germany). Phosphoric acid was from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). All other chemicals were of analytical grade and used without further purification. Solutions were prepared in deionized, double-distilled water.

### 2.2 Peptide synthesis

The peptide substrates were synthesized by standard solid-phase peptide synthesis procedures using Fmoc chemistry at the 0.4 g scale on Rink-amide MBHA (4-methylbenzhydrylamine, 0.73 mmol/g) resin. Briefly, the resin was deprotected with 20% piperidine in DMF, followed by washing with DMF and dichloromethane. Subsequently, the Fmoc amino acid (4 equiv.), HBTU (*O*-benzotriazole-*N,N,N'*,*N'*-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphate, 4 equiv.), HOBt (hydroxybenzotriazole, 4 equiv.) and DIEA (*N,N*-diisopropylethylamine, 8 equiv.) in DMF were added to the resin. The reaction was allowed to proceed for 1 h after which the coupling step was repeated for 30 min following a washing step with DMF in between. Upon washing with DMF the Fmoc group was removed by treatment with 20% piperidine in DMF. After washing with DMF and dichloromethane, alternately, the next amino acid was attached. Peptide cleavage was performed with 95% trifluoroacetic acid (TFA), 2.5% TIPS (triisopropylsilane) and 2.5% water for 2–3 h at room temperature. After precipitation in cold diethyl ether, peptides were centrifuged and washed several times with diethyl ether prior to lyophilization from water and 80% tert.-butanol, respectively. The crude peptides were purified by semipreparative HPLC on a Shimadzu LC 8A HPLC-instrument (Shimadzu, Duisburg, Germany) equipped with a Knauer Eurospher 100 C18

column (Knauer, Berlin, Germany) using a gradient of 0–50% eluent B for 120 min at a flow rate of 10 mL/min (eluent A: 0.1% TFA in water; eluent B: 0.1% TFA in 90% acetonitrile/water). Detection was at 220 nm. The purity of the peptides was assessed by analytical HPLC on a Shimadzu LC-10AT instrument equipped with a Vydac 218TP54 C18 reversed-phase column (5  $\mu\text{m}$  particle size, 300 Å pore size, 4.6  $\times$  25 mm) and CE. The identity of the peptides was verified by MALDI TOF mass spectrometry on a Laser Tec Research spectrometer (Perseptive Biosystems, Wiesbaden, Germany) using  $\alpha$ -cyanohydroxycinnamic acid as the matrix.

### 2.3 CE

CE was performed on a Beckman P/ACE 5510 instrument (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) equipped with a diode array detector using a 30/37 cm, 50  $\mu\text{m}$  ID capillary from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). New capillaries were rinsed with 1.0 M aqueous sodium hydroxide for 30 min, 5 min with water, 30 min with 1.0 M hydrochloric acid, and again with water for 5 min. The optimized BGE consisted of 200 mM phosphate buffer adjusted to pH 2.7 by a 2.0 M Tris solution. Separations were performed at 20 kV at a temperature of 25°C. Samples were introduced by hydrodynamic injections for 10 s after a hydrodynamic injection of 0.2 M NaOH for 20 s. Injection pressure was 0.5 psi in all cases. UV detection was carried out at 220 nm. The corrected peak areas were used for analyte quantification.

### 2.4 SIRT1 assay

Ten millimolar stock solutions of the peptide substrates were prepared in a buffer consisting of 50 mM Tris, pH 8.0, containing 137 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium chloride and 1 mM magnesium chloride and stored at –30°C. Ten millimolar  $\text{NAD}^+$  stock solutions were prepared in the same buffer directly before the assay. Incubations were performed in a 50 mM Tris buffer, pH 8.0, containing 137 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium chloride, 1 mM magnesium chloride and 1 mg/mL BSA. The enzyme activity was 2.5 U SIRT1 per 100  $\mu\text{L}$  assay solution. The concentration of the substrates was 100  $\mu\text{M}$ , and the  $\text{NAD}^+$  concentration was 500  $\mu\text{M}$ . Prior to the assay, enzyme and substrate solutions were preincubated at 37°C for 10 min. The reaction was initiated by mixing SIRT1 and substrate solutions and carried out at 37°C. At selected time intervals 50  $\mu\text{L}$  aliquots of the incubation mixture were quenched by adding 5  $\mu\text{L}$  of ice-cold 25% TCA and immersing the sample in an ice bath for 15 min followed by centrifuging at 10 000 rpm for 10 min. The supernatant was injected into the CE system. Blank and control experiments were performed by omitting either SIRT1 or  $\text{NAD}^+$  from the reaction mixture.



### 3 Results and discussion

#### 3.1 Peptide substrates

The substrates are based on the amino acid sequence of the protein p53, a known substrate of SIRT1, where acetylation/deacetylation occurs at lysine 382 [20]. The amino acid sequence of residues 379–383 of p53 is RHKK(Ac)L. Thus, the acetylated dipeptide derivative Fmoc-KK(Ac)-NH<sub>2</sub> (RL2), the tripeptide Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub> (RL6) and the tetrapeptide Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub> (RL4) were synthesized along with the corresponding deacetylated peptides Fmoc-KK-NH<sub>2</sub> (RL1), Fmoc-KKL-NH<sub>2</sub> (RL5) and Fmoc-RHKK-NH<sub>2</sub> (RL3) by standard solid-phase peptide chemistry. The structures are summarized in Fig. 1.

The N-terminal Fmoc-group was not cleaved in the final deprotection steps of solid-phase synthesis in order to provide a chromophore for UV or fluorescence detection. This is in contrast to the short peptide-based sirtuin substrates used in most studies, which display UV or fluorescence labels on the C-terminus [10–14, 16]. It has been shown that a fluorophore on the C-terminus may affect the binding of the substrate by sirtuin enzymes [11]. The KK motif was kept in all peptides in order to ensure a charge for the electrophoretic migration of the acetylated peptides. The purity of all peptides was greater than 97% as determined by analytical HPLC and CE. The identity was confirmed by MALDI TOF mass spectrometry.

#### 3.2 Capillary electrophoresis method development

##### 3.2.1 Initial assay conditions

The pK<sub>a</sub> of the side chain amino group of lysine is about 10.5 in polypeptides [21] so that both the acetylated and deacetylated peptides are positively charged over a wide pH range due to at least one lysine residue. Initially, the CE separation of the respective peptide pairs was studied in the pH range 2–4 and pH 6–9. A sodium phosphate buffer, pH 2.7, and a 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)-Tris buffer, pH 6.8, were found suitable. The pH 6.8 buffer allowed the efficient separation of the analytes within 5 min. However, the co-product of the enzymatic reaction, nicotinamide, could not be monitored at pH 6.8 due to comigration with the electroosmotic flow. As it was desirable to be able to analyze nicotinamide as well the phosphate buffer, pH 2.7 was selected for further method development. NAD<sup>+</sup> and 2'-O-acetyl-ADP-ribose could not be detected at pH 2.7.

The assay buffer recommended by the supplier of SIRT1 has a high salt content, which will lead to peak distortion upon injection into a low concentrated analysis buffer. This was also observed when using 100 mM sodium phosphate, pH 2.7, as the BGE. Increasing the buffer concentration to 200 mM led to a high current (150  $\mu$ A), which may cause excessive Joule heating. Therefore, a

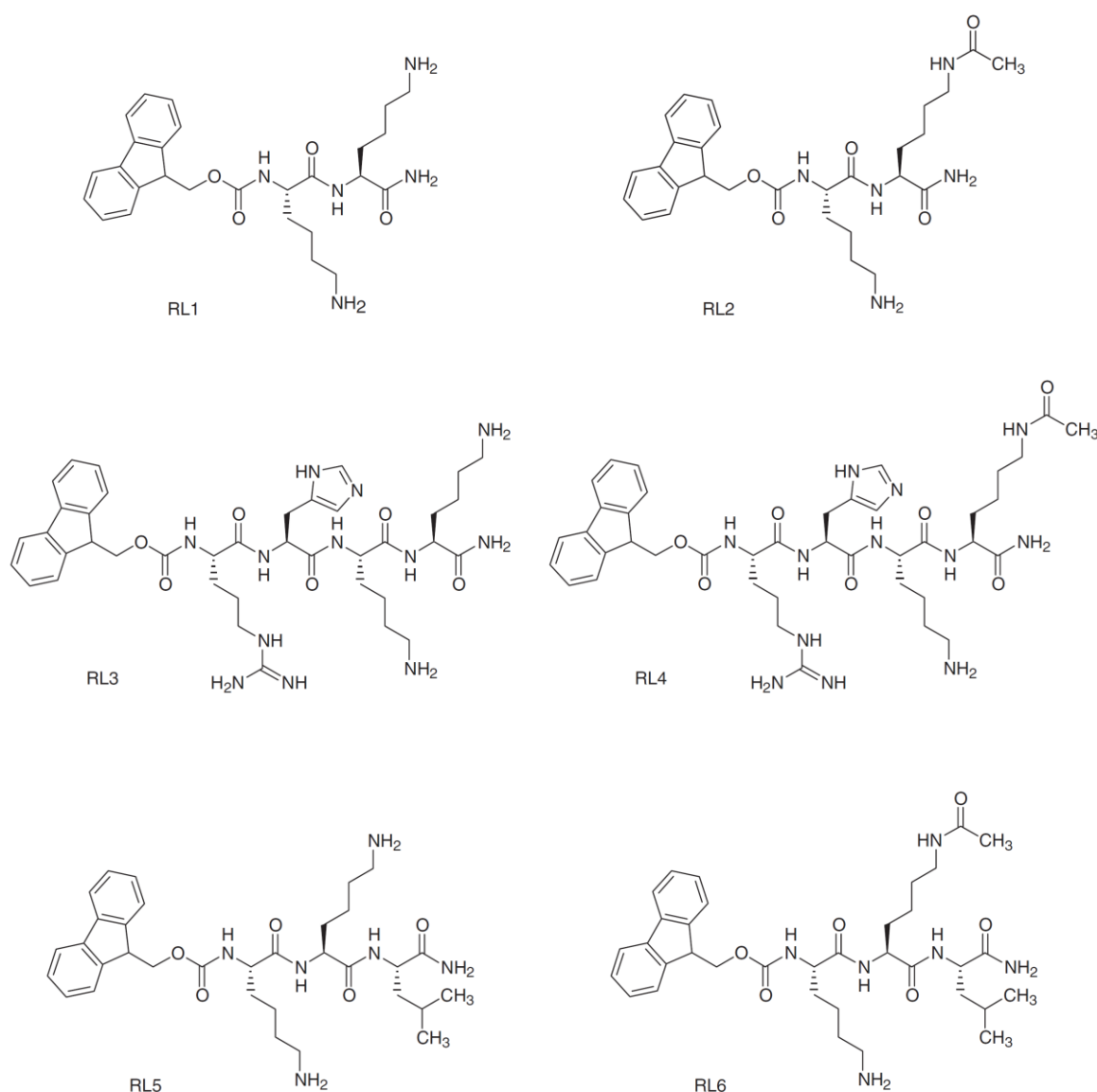
200 mM phosphate-Tris buffer was selected instead of a sodium phosphate buffer, which provided a much lower current and a decrease in the baseline noise. Application of a voltage of 20 kV resulted in a current of about 95  $\mu$ A. All peptides as well as nicotinamide could be separated under these experimental conditions in a capillary with an effective length of 30 cm within 10 min.

Enzymatic reactions require a quenching step in order to stop the reaction. For SIRT1 assays reported in the literature this has been achieved by the addition of 0.5% TFA [15], 2 mM nicotinamide [6] or 1 M hydrochloric acid/0.4 M sodium acetate [14]. However, these procedures were not applicable for the present assay as it was required not only to stop the enzymatic reaction but also to precipitate proteins in the sample. The enzyme assay buffer contained 1 mg/mL of BSA, which might adsorb onto the capillary wall causing low assay repeatability. Thus, 1–10% aqueous TCA was investigated for protein precipitation. A TCA concentration below 2.5% did not result in complete protein precipitation yielding a broad matrix peak in the electropherograms. At 2.5% TCA, the recoveries of the analytes were better than 91% and no obvious interfering matrix peaks were detected. Higher TCA concentrations did not improve recoveries but resulted in peak deformation primarily due to a change in the matrix components with a high acid content resulting in a pH of less than 1. Therefore, 2.5% TCA was selected for stopping the enzyme reaction and deproteinization of the sample.

##### 3.2.2 Sodium hydroxide-mediated sample stacking

As discussed above, peak deformation due to the high salt content of sample matrix could be overcome by using a BGE with high ionic strength. However, this was not adequate to compensate for the high acid content resulting from TCA addition, which further complicated the injected sample matrix. Peak deformation was observed and peak efficiency decreased significantly when the sample injection time was longer than 3 s. However, larger injection volumes are desirable in order to achieve low detection and quantitation limits.

Various stacking methods have been described to overcome the inherent limitation of CE regarding the low concentration detection sensitivity of UV-absorbance-based methods [22, 23]. Among them, the field-amplified stacking method is most widely used for improving the detection sensitivity, where the sample to CE buffer conductivity ratio is a critical parameter and has to be as low as possible [24]. However, for samples of biological origin the complex matrix, especially the high salt content, often prevents the application of field-amplified stacking. Stacking methods for such samples based on pH-mediated techniques are more suitable as these are able to modify the migration behavior of analytes within the capillary by changing the BGE conductivity or the ionization state of the analyte. pH-mediated stacking by introducing a strong acid or base after the injection of the sample and the dynamic pH junction



**Figure 1.** Structures of peptide substrates RL2, RL4 and RL6 and their deacetylated products RL1, RL3 and RL5.

utilizing a proper combination of BGE and sample matrix have been demonstrated to be simple and effective for cationic as well as anionic analytes [25–28].

A sodium hydroxide-mediated stacking procedure was developed for the present assay by injecting a sodium hydroxide solution hydrodynamically before the injection of a mixture of peptide standards and nicotinamide in the high salt assay buffer containing 2.5% TCA. The results are summarized in Fig. 2. Except for the deacetylated tetrapeptide RL3 all compound peaks were severely deformed upon injection of the sample solution for 10 s (Fig. 2A). Improvement of the peak shape of the early migrating compounds can be achieved upon injection of a 20 s plug of 0.1 M sodium

hydroxide (Fig. 2B). Optimizing the ratio between sample injection time and concentration and injection time of sodium hydroxide solutions demonstrated that a further increase in the sodium hydroxide concentration to 0.2 M resulted in sharp peaks of the later migrating compounds as well (Fig. 2C). A 0.3 M sodium hydroxide solution is able to stack a sample plug of 15 s (Fig. 2D). The focusing effect can also be estimated from the peak width at half peak height,  $W_{1/2}$ , listed in Table 1, which significantly improved for the peptide analytes. The peak width did not change in the case of nicotinamide. Simultaneously, this resulted in an increase in detection sensitivity by a factor of 5–7 as can be derived from the increasing peak height observed for all analytes (Table 1).



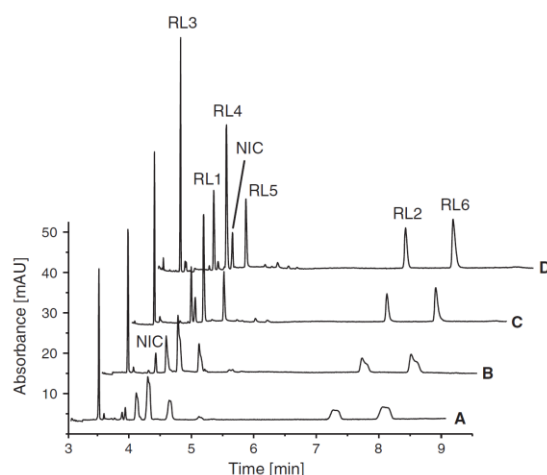
The mechanism of sodium hydroxide-mediated stacking is similar to that of pH-mediated stacking where an additional plug of strong base is introduced. For the stacking method presented here, the generation of a low-conductivity zone and analyte focusing occur only after the application of the high voltage. One can assume that hydroxide ions from the plug of the base migrate into the acidic sample zone titrating protons to water and, thus, generating a low conductivity zone. The peptide analytes that are positively charged over a wide pH range will maintain this charge and are focused by the field-amplified stacking effect. This is also the reason for the slightly shorter migration times observed

for the peptides under these conditions. In contrast, the migration time of nicotinamide became longer by sodium hydroxide-mediated stacking. This may be explained by the much lower  $pK_a$  value of 3.4 of nicotinamide. In the low conductive zone the ionization state of nicotinamide changes to neutral slowing the migration of the compound. Besides a longer migration time the focusing is not as effective as for the positively charged peptide derivatives as can be seen from the peak efficiency data compiled in Table 1.

In theory, longer sodium hydroxide plugs at higher concentrations may be employed, but this is limited under the conditions of the present method. If the low conductivity zone becomes too long, current breakdown due to lack of support of the electroosmotic flow or bubble formation from excessive Joule heating may occur [25]. However, using these conditions no further optimization of the BGE or the sample matrix was necessary for an efficient analysis of the compounds when injecting a sample plug for 10 s combined with an injection of 0.2 M sodium hydroxide for 20 s.

### 3.2.3 Method validation

The assay was validated for the peptide substrates, their corresponding deacetylated products and nicotinamide under the optimized experimental conditions with respect to range, linearity, limit of detection, limit of quantitation and recovery. The data are summarized in Table 2. Six concentration levels of the analytes each analyzed in triplicate were used for the determination of assay range. Correlation coefficients ( $r^2$ ) were at least 0.9915. LOQs of 5 to 23  $\mu\text{M}$  were estimated from the lowest concentration of the calibration range extrapolated to a signal to noise ratio of 10. LODs (signal-to-noise ratio of 3) were between 1.5 and 6.8  $\mu\text{M}$ . Recovery was estimated by comparison of standards dissolved in the assay buffer without BSA and standards dissolved in the assay buffer with



**Figure 2.** Electropherograms obtained from (A) direct injection of the sample for 10 s; (B) hydrodynamic injection of 0.1 M NaOH for 20 s before the injection of the sample for 10 s; (C) hydrodynamic injection of 0.2 M NaOH for 20 s before the injection of the sample for 10 s; (D) hydrodynamic injection of 0.3 M NaOH for 20 s before the injection of the sample for 15 s. Other CE conditions: 30/37 cm fused-silica capillary, 50  $\mu\text{m}$  ID, 200 mM phosphate-Tris buffer, pH 2.7, 20 kV, 25  $^{\circ}\text{C}$ ; detection at 220 nm. NIC, nicotinamide.

**Table 1.** Comparison of migration time  $t_m$ , peak width at half peak height  $W_{1/2}$ , plate number  $N$ , and peak height of the peptides and nicotinamide before and after sodium hydroxide-mediated sample stacking

Compound	No NaOH <sup>a)</sup>				0.2 M NaOH <sup>b)</sup>				0.3 M NaOH <sup>c)</sup>			
	$t_m$ (min)	$W_{1/2} \times 1000$ (min)	$N$	Peak height (mAU)	$t_m$ (min)	$W_{1/2} \times 1000$ (min)	$N$	Peak height (mAU)	$t_m$ (min)	$W_{1/2} \times 1000$ (min)	$N$	Peak height (mAU)
RL1	4.04	47.5	40076	6.64	3.95	18.86	243008	13.91	3.88	18.75	237230	19.72
RL2	7.20	153.67	12161	2.35	7.08	44.97	137319	6.86	6.95	44.70	133926	9.69
RL3	3.45	13.45	364505	37.52	3.36	12.31	412736	42.16	3.35	12.47	399822	57.93
RL4	4.22	60.24	27187	10.62	4.15	21.61	204313	26.60	4.09	22.28	186692	35.72
RL5	4.57	66.78	25945	4.78	4.47	22.66	215578	12.14	4.40	23.18	199612	16.94
RL6	7.98	181.99	10651	2.98	7.86	54.76	114137	8.34	7.71	55.14	108314	12.00
Nicotinamide	3.87	18.49	242693	3.09	4.01	23.32	163810	6.23	4.18	20.69	226121	9.06

a) Hydrodynamic injection of the sample for 10 s, without sodium hydroxide-mediated stacking.

b) Hydrodynamic injection of 0.2 M sodium hydroxide for 20 s before the injection of the sample for 10 s.

c) Hydrodynamic injection of 0.3 M sodium hydroxide for 20 s before the injection of the sample for 15 s. Injection pressure: 0.5 psi.

**Table 2.** Validation parameters: linearity, correlation coefficient, LOQ, LOD and recovery

Parameter	RL1	RL2	RL3	RL4	RL5	RL6	Nicotinamide
Range ( $\mu\text{M}$ )	15–250	15–250	5–250	10–250	15–250	25–250	15–250
Correlation coefficient ( $r^2$ )	0.9915	0.9986	0.9971	0.9939	0.9967	0.9926	0.9987
LOQ ( $\mu\text{M}$ )	11	15	5	7.5	13	23	15
LOD ( $\mu\text{M}$ )	3.3	4.5	1.5	2.2	3.9	6.8	4.6
Recovery (%) ( $n = 3 \pm \text{SD}$ )	$100.3 \pm 1.7$	$98.7 \pm 1.1$	$101.7 \pm 1.9$	$99.4 \pm 2.1$	$102.3 \pm 0.5$	$91.3 \pm 4.5$	$100.8 \pm 1.9$

**Table 3.** RSD values of migration time and corrected peak area

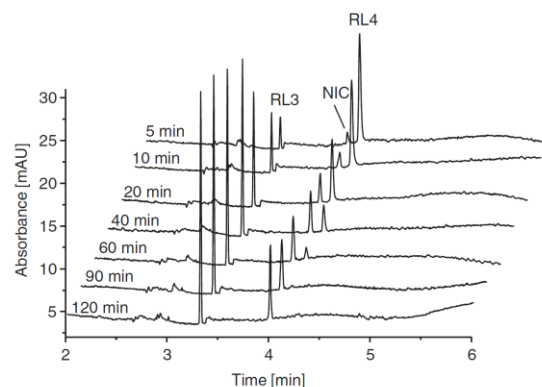
	RL1	RL2	RL3	RL4	RL5	RL6	Nicotinamide
Intraday precision							
Migration time	0.7	0.5	0.7	0.6	0.5	0.6	0.3
Peak area	2.2	2.7	1.4	1.6	3.0	2.2	1.9
Interday precision							
Migration time	1.3	0.9	0.8	1.4	1.2	1.1	0.9
Peak area	3.4	5.5	3.0	3.0	4.3	5.2	3.1

BSA, which were also subjected to the acid protein precipitation step. Except for RL6 where recovery was only about 91% the presence of BSA and the protein precipitation step by TCA did not significantly affect the other analytes.

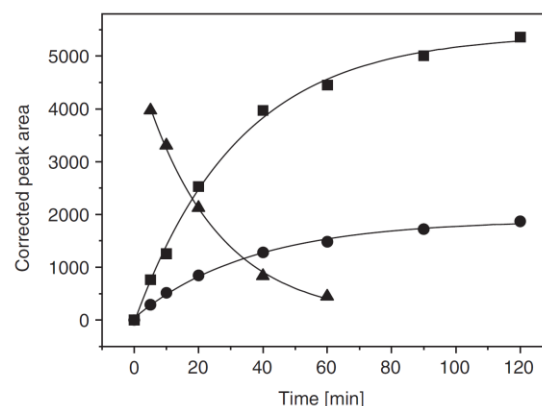
Assay precision with regard to migration time and corrected peak area was determined at the 100  $\mu\text{M}$  level of the analytes. For intraday precision the samples were injected six times within one day while interday precision was assessed in three days analyzing each sample in triplicate. The results are summarized in Table 3. Generally, acceptable relative standard deviation (RSD) values for corrected peak areas between 1.4 and 3.0% for intraday and from 3.0 to 5.5% for interday precision were observed. RSD values for migration time varied between 0.3 and 0.7% (intraday precision) and between 0.8 and 1.4% (interday precision).

### 3.3 SIRT1 assay

The acetylated peptides RL2, RL4 and RL6 were evaluated as substrates for SIRT1 at a concentration of 100  $\mu\text{M}$ . Aliquots of the reaction mixture were removed at selected time intervals, quenched by the addition of ice-cold TCA and subsequently analyzed by CE. All substrates were effectively deacetylated by SIRT1. Upon omitting either SIRT1 or the cofactor  $\text{NAD}^+$  from the incubation mixture no conversion of any substrate was observed within 2 h verifying that the deacetylation was in fact due to the enzymatic reaction by SIRT1. Electropherograms of the incubation of the tetrapeptide derivative RL4 are shown in Fig. 3. The decrease in RL4 is paralleled by an increase in the peak of the product RL3 and of the byproduct nicotinamide. The time course of the reaction is summarized in Fig. 4.

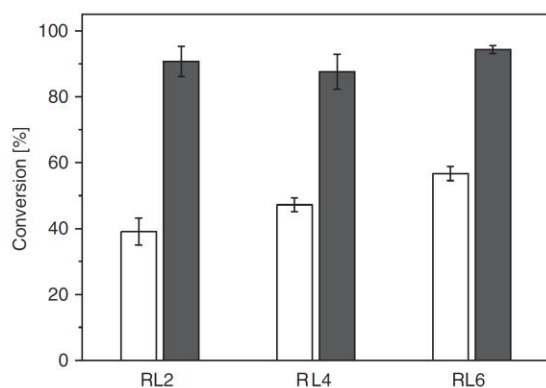


**Figure 3.** Electropherograms obtained for SIRT1 deacetylation with RL4 as substrate at different reaction times. Experimental conditions: 30/37 cm fused-silica capillary, 50  $\mu\text{m}$  ID, 200 mM phosphate-Tris buffer, pH 2.7, 20 kV, 25  $^{\circ}\text{C}$ ; detection at 220 nm; sample injection: 0.5 psi for 10 s following 20 s of 0.2 M NaOH. NIC, nicotinamide.



**Figure 4.** Time-dependent formation of RL3 and nicotinamide upon incubation of 100  $\mu\text{M}$  tetrapeptide RL4 in the presence of 2.5 U/100  $\mu\text{L}$  SIRT1.  $\blacktriangle$ , RL4;  $\blacksquare$ , RL3;  $\bullet$ , nicotinamide.

All substrates were effectively deacetylated by SIRT1. The percent conversion after an incubation time of 20 and 60 min is shown in Fig. 5. At least 87% of the acetyl-lysine peptides had reacted after 60 min using an enzyme activity of 2.5 U per 100  $\mu\text{L}$  incubation mixture. This is at least as effective as reported for other substrates in the literature. For example, 90% of Z-MAL was deacetylated in the



**Figure 5.** Percent conversion of RL2, RL4 and RL6 after incubation in the presence of 2.5 U/100  $\mu$ L SIRT1. Open bars, 20 min; filled bars, 60 min ( $n = 3 \pm \text{SD}$ ).

presence of 17.5 U of SIRT1 after an incubation period of 8 h [14].

#### 4 Concluding remarks

Three short Fmoc-labeled acetyl-lysine peptide derivatives based on the amino acid sequence of p53 were synthesized and evaluated as substrates for sirtuin enzymes. Deacetylation was monitored by a CE method, that can simultaneously analyze nicotinamide, which is another reaction product. By integrating a simple sodium hydroxide-mediated stacking procedure the high salt and acid content of the sample could be overcome resulting in a rapid, sensitive, accurate and repeatable method allowing the analysis of the enzyme activity as demonstrated for the human isoenzyme SIRT1. All three new substrates were effectively deacetylated by SIRT1. Compared with other assays the present CE-based method does not require larger peptide substrates that are more expensive and more difficult to obtain. Thus, the present CE-based SIRT1 assay provides an alternative method for other assays. Moreover, the method allows the simultaneous determination of the substrate, the deacetylated peptide and nicotinamide as the enzymatic reaction product of  $\text{NAD}^+$ , which is not the case in radioactive or fluorescence assays. Further characterization of the substrates toward other sirtuin isoenzymes and the application of the assay for the identification of enzyme inhibitors are currently underway.

The financial support of Yi Fan by the Alexander von Humboldt Foundation (Bonn, Germany) is gratefully acknowledged.

The authors have declared no conflict of interest.

#### 5 References

- [1] Tanner, K. G., Landry, J., Sternglanz, R., Denu, J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, **97**, 14178–14182.
- [2] Haigis, M. C., Guarente, L. P., *Gene Dev.* 2006, **20**, 2913–2921.
- [3] Michan, S., Sinclair, D., *Biochem. J.* 2007, **404**, 1–13.
- [4] Smith, B. C., Denu, J. M., *J. Biol. Chem.* 2007, **282**, 37256–37265.
- [5] Bedalov, A., Gatabonton, T., Irvine, W. P., Gottschling, D. E., Simon, J. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, **98**, 15113–15118.
- [6] Kaerberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J. et al., *J. Biol. Chem.* 2005, **280**, 17038–17045.
- [7] Jackson, M. D., Denu, J. M., *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 18535–18544.
- [8] Borra, M. T., Langer, M. R., Slama, J. T., Denu, J. M., *Biochemistry* 2004, **43**, 9877–9887.
- [9] Borra, M. T., Denu, J. M., *Methods Enzymol.* 2004, **376**, 171–187.
- [10] Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W. et al., *Nature* 2003, **425**, 191–196.
- [11] Borra, M. T., Smith, B. C., Denu, J. M., *J. Biol. Chem.* 2005, **280**, 17187–17195.
- [12] Mai, A., Massa, S., Lavu, S., Pezzi, R. et al., *J. Med. Chem.* 2005, **48**, 7789–7795.
- [13] Heltweg, B., Trapp, J., Jung, M., *Methods* 2005, **36**, 332–337.
- [14] Heltweg, B., Dequiedt, F., Verdin, E., Jung, M., *Anal. Biochem.* 2003, **319**, 42–48.
- [15] Marcotte, P. A., Richardson, P. R., Guo, J., Barrett, L. W. et al., *Anal. Biochem.* 2004, **332**, 90–99.
- [16] de Boer, V. C. J., de Goffau, M. C., Arts, I. C. W., Hollman, P. C. H., Keijer, J., *Mech. Aging Dev.* 2006, **127**, 618–627.
- [17] Liu, Y., Gerber, R., Wu, J., Tsuruda, T., McCarter, J. D., *Anal. Biochem.* 2008, **378**, 53–59.
- [18] Glatz, Z., *J. Chromatogr. B* 2006, **841**, 23–37.
- [19] Zhang, J., Hoogmartens, J., Van Schepdael, A., *Electrophoresis* 2008, **29**, 56–65.
- [20] Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng Eaton, E., Imai, S. I. et al., *Cell* 2001, **107**, 149–159.
- [21] Gao, G., Prasad, R., Lodwig, S. N., Unkefer, C. J. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2006, **128**, 8104–8105.
- [22] Sentellas, S., Puignou, L., Galceran, M. T., *J. Sep. Sci.* 2002, **25**, 975–987.
- [23] Arnett, S. D., Lunte, C. E., *Electrophoresis* 2003, **24**, 1745–1752.
- [24] Weiss, D. J., Saunders, K., Lunte, C. E., *Electrophoresis* 2001, **22**, 59–65.
- [25] Breadmore, M. C., *Electrophoresis* 2007, **28**, 254–281.
- [26] Malá, Z., Krivánková, L., Gebauer, P., Boček, P., *Electrophoresis* 2007, **28**, 243–253.
- [27] Britz-McKibbin, P., Chen, D. D. Y., *Anal. Chem.* 2000, **72**, 1242–1252.
- [28] Imami, K., Monton, M. R. N., Ishihama, Y., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2007, **1148**, 250–255.

## Manuskript 4

### 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-labeled peptides as substrates in a capillary electrophoresis-based assay for sirtuin enzymes

Yi Fan, Ronny Ludewig, Gerhard K. E. Scriba.

*Analytical Biochemistry* **2009**, 387, 243 - 248.

Ausgehend vom Manuskript 3 wurden die drei Fmoc-gelabelten acetylierten Modellsubstanzen Fmoc-Lys-Lys(Ac)NH<sub>2</sub>, Fmoc-Lys-Lys(Ac)LeuNH<sub>2</sub> und Fmoc-Arg-His-Lys-Lys(Ac)NH<sub>2</sub> an zwei humanen Sirtuinen getestet. Die Deacetylierung wurde mittels validierten CZE-Verfahren charakterisiert. Die kinetischen Daten der jeweiligen Enzymreaktion (*SIRT1* und *SIRT2*) wurden ermittelt. Weiterhin wurden IC<sub>50</sub>-Werte durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren der Sirtuine evaluiert.

**Eigenanteil:** Vermessung der Inkubationsproben mittels CZE und Auswertung der Daten, Mitwirkung an der Erstellung des Manuskripts.





Contents lists available at ScienceDirect

## Analytical Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yabio](http://www.elsevier.com/locate/yabio)

## 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-labeled peptides as substrates in a capillary electrophoresis-based assay for sirtuin enzymes

Yi Fan, Ronny Ludewig, Gerhard K.E. Scriba\*

Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 21 November 2008

Available online 3 February 2009

## Keywords:

Sirtuin

Peptide substrate

Deacetylation

Capillary electrophoresis

## ABSTRACT

Sirtuins are the class III histone deacetylases that catalyze the deacetylation of acetyl-lysine residues of histones and other proteins using nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) as the cofactor. The reaction yields the deacetylated protein, nicotinamide, and 2'-O-acetyl-ADP-ribose. Three 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-labeled peptides derived from the amino acid sequence of p53, Fmoc-KK(Ac)-NH<sub>2</sub>, Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub>, and Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub>, were characterized as substrates for two of the human sirtuins: SIRT1 and SIRT2. The deacetylation was monitored by a validated capillary electrophoresis assay. Efficient deacetylation by SIRT1 and SIRT2 was demonstrated for all three peptide substrates. The kinetics of the enzymatic reaction was determined with the Michaelis constants ( $K_m$ ) varying between 16.7 and 34.6  $\mu$ M for SIRT1 and between 34.7 and 58.6  $\mu$ M for SIRT2. Resveratrol did not function as an activator for SIRT1 using the Fmoc-labeled peptides as SIRT substrates. The IC<sub>50</sub> values of sirtinol using the three peptide substrates were determined. Further sirtuin inhibitors were also evaluated.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Sirtuins, the class III histone deacetylases, are a family of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>)-dependent enzymes that catalyze the deacetylation of acetyl-lysine residues of histones and other proteins. The enzymes possess a unique catalytic mechanism coupling the cleavage of NAD<sup>+</sup> and protein deacetylation that yields nicotinamide, the deacetylated protein, and 2'-O-acetyl-ADP-ribose as product [1–3]. In humans, seven sirtuin enzymes are known, SIRT1 to SIRT7, which have diverse cellular locations, target multiple substrates, and affect a broad range of processes such as proliferation, differentiation, metabolism, apoptosis, and senescence [2–4]. Thus, sirtuins are attractive targets for drug discovery, so that extensive research has focused on understanding their catalytic mechanism as well as the development of activators and inhibitors.

Whereas initial assays employed radioactive protein substrates [1,5,6] or radioactive cofactors [7,8], further assays employed primarily fluorescent substrates that can be analyzed by microplate readers. A commercial version is the Flour-de-Lys assay that is based on an acetylated tetrapeptide containing 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) at the C terminus. On deacetylation, the peptide becomes a substrate for trypsin releasing the fluorophore, resulting in an in-

crease in fluorescence [9,10]. A similar principle underlies the Z-Lys(Ac)-AMC (Z-MAL) substrate [11,12]. A fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based assay with peptide substrates containing 18 or 19 amino acid residues, a fluorophore at the C terminus, and a quencher at the N terminus was developed by Marcotte and coworkers [13]. The high-performance liquid chromatography (HPLC) separation of acetyl peptides and the respective deacetylated peptides following the enzyme reaction has been reported [1,8,14]. Moreover, a microfluidic mobility shift assay has been reported using 22- or 23mer fluorescein-labeled peptides and Caliper's sipper chips, including specific coating reagents [15]. With regard to peptide substrates, it has been observed that the amino acids within the –2 to +2 positions of acetyl-lysine affect peptide deacetylation by sirtuins [16,17]. Finally, deacetylation of protein substrates such as cytochrome c and glutamate dehydrogenase was monitored by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [18].

Recently, three 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-labeled peptides derived from the amino acid sequence 379 to 383 of p53 (a known substrate of SIRT1), Fmoc-KK(Ac)-NH<sub>2</sub>, Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub>, and Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub>, have been synthesized and evaluated as substrates for SIRT1 using a validated capillary electrophoresis (CE) method [19]. The Fmoc-labeled peptides are simple to synthesize and do not require additional derivatization to introduce a fluorescent label. Besides analysis of the peptides, CE also allowed the simultaneous determination of nicotinamide as another reaction product that adds to the specificity of the assay. Moreover, the difference of the new peptides compared with reported small peptide substrates is the fact that they are labeled at the N terminus. This

\* Corresponding author. Fax: +49 3641 949802.

E-mail address: [gerhard.scriba@uni-jena.de](mailto:gerhard.scriba@uni-jena.de) (G.K.E. Scriba).

<sup>1</sup> Abbreviations used: NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adenine dinucleotide; AMC, 7-amino-4-methylcoumarin; Z-MAL, Z-Lys(Ac)-AMC; FRET, fluorescence resonance energy transfer; HPLC, high-performance liquid chromatography; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl; CE, capillary electrophoresis; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; TCA, trichloroacetic acid; BSA, bovine serum albumin; UV, ultraviolet; DMSO, dimethyl sulfoxide.

may lead to different specificity of sirtuins toward the new substrates and affect their conversion in the presence of inhibitors or activators, resulting in a further understanding of the respective mechanisms. Thus, the aim of the current study was a more thorough characterization of the peptides as substrates for recombinant human SIRT1 and SIRT2, including their use for the determination of possible activators and inhibitors of the enzymes.

## Materials and methods

### Chemicals and reagents

Human recombinant SIRT1 and SIRT2, as well as resveratrol (98%) and Ro 31-8220 (3-[1-[3-(amidinothio)propyl]-1H-indol-3-yl]-3-(1-methyl-1H-indol-3-yl)maleimide) were purchased from Biomol GmbH (Hamburg, Germany). NAD<sup>+</sup> was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Sirtinol (97%), tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), trichloroacetic acid (TCA), and bovine serum albumin (BSA) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). GF 109203X (2-[1-(3-dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimide) was obtained from Applchem GmbH (Darmstadt, Germany), and phosphoric acid was obtained from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). Two splitomicin derivatives, 8-bromo- $\alpha$ -phenylsplitomicin and 8-bromo- $\beta$ -phenylsplitomicin, were a gift from Manfred Jung (University of Freiburg). All other chemicals were of analytical grade. Solutions were prepared in double-distilled water.

The peptide substrates, Fmoc-KK(Ac)-NH<sub>2</sub>, Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub>, and Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub>, and their estimated deacetylated products, Fmoc-KK-NH<sub>2</sub>, Fmoc-KKL-NH<sub>2</sub>, and Fmoc-RHKK-NH<sub>2</sub>, were synthesized by solid phase peptide synthesis as described previously [19]. The purity exceeded 97% as determined by HPLC.

### Capillary electrophoresis

CE was performed on a Beckman P/ACE 5510 instrument (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) equipped with a diode array detector. Fused-silica capillaries (50  $\mu$ m) with an effective length of 30 cm and a total length of 37 cm were obtained from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). New capillaries were rinsed for 30 min with 1.0 M aqueous sodium hydroxide, for 5 min with water, for 30 min with 1.0 M hydrochloric acid, and again for 5 min with water. The background electrolyte consisted of 200 mM phosphate buffer with the pH adjusted to 2.7 by the addition of a 2.0 M Tris solution. Separations were performed at 20 kV at a temperature of 25 °C. Ultraviolet (UV) detection at 220 nm was performed at the cathodic end. Samples were introduced by hydrodynamic injections for 10 s after a hydrodynamic injection of 0.2 M NaOH for 20 s. Injection pressure was 0.5 psi in all cases. Corrected peak areas were used for analyte quantification.

### Sirtuin assay

For sirtuin assay, 10 mM stock solutions of the peptide substrates were prepared in assay buffer consisting of 50 mM Tris (pH 8.0) containing 137 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium chloride, and 1 mM magnesium chloride and were stored at –30 °C. Also, 10-mM NAD<sup>+</sup> stock solutions were prepared in the same buffer directly before the assay. Incubations were performed in a 50 mM Tris buffer (pH 8.0) containing 137 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium chloride, 1 mM magnesium chloride, and 1 mg/ml BSA. The enzyme activities were 2.5 U/100  $\mu$ l for SIRT1 and 5 U/100  $\mu$ l for SIRT2. The final concentration of the substrates was 100  $\mu$ M, and the concentration of NAD<sup>+</sup> was 500  $\mu$ M. Prior to the assay, enzyme and substrate solutions were preincubated at

37 °C for 10 min. The reaction was initiated by mixing enzyme and substrate solutions and was carried out at 37 °C. At selected time intervals, 50  $\mu$ l aliquots of the incubation mixture were quenched by adding 5  $\mu$ l of ice-cold 25% TCA and immersing the sample in an ice bath for 15 min, followed by centrifuging at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was injected into the CE system. Blank and control experiments were performed by omitting either the sirtuins or NAD<sup>+</sup> from the reaction mixture.

For the characterization of the enzyme kinetic parameters,  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ , and  $k_{cat}/K_m$ , concentrations of the substrates varying between 0 and 125  $\mu$ M were used. Incubation times of 15 min for SIRT1 and 3 h for SIRT2 were selected to calculate the initial velocity of deacetylation. Each concentration was determined in three independent experiments. The plots of initial velocities versus substrate concentration were fitted to the Michaelis–Menten equation for each substrate.

### Enzyme activation and inhibition

The activation of SIRT1 by resveratrol and inhibition studies were carried out as described above for the general assay. The concentration of resveratrol varied between 50 and 500  $\mu$ M. The inhibition of SIRT1 and SIRT2 by sirtinol was evaluated using concentrations between 10 and 520  $\mu$ M. Due to the low aqueous solubility of sirtinol, dimethyl sulfoxide (DMSO) was added at concentrations less than 5% (v/v). IC<sub>50</sub> values were calculated by four-parameter logistic nonlinear regression using Origin software, and the  $K_i$  values were calculated by the Chen–Prusoff equation. The inhibition of the sirtuin enzymes by the other inhibitors was characterized by determination of the remaining activity of enzymes at inhibitor concentrations of 10 and 50  $\mu$ M, respectively. Each experiment was performed in triplicate, and each sample was analyzed twice.

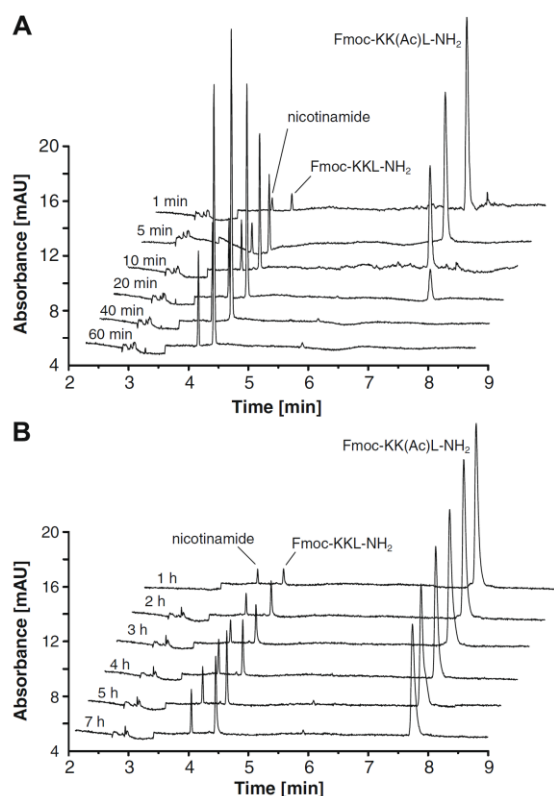
## Results and discussion

### Deacetylation of Fmoc-labeled peptide substrates by SIRT1 and SIRT2

Based on the amino acid sequence 379 to 383 of p53, a known substrate of sirtuins, Fmoc-labeled small peptides Fmoc-KK(Ac)-NH<sub>2</sub>, Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub>, and Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub>, as well as the corresponding deacetylated derivatives, have been synthesized [19]. A CE-based assay was subsequently developed and validated [19]. All acetylated peptides proved to be substrates of SIRT1 and SIRT2. Fig. 1 summarizes electropherograms of the deacetylation of Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub> by SIRT1 (Fig. 1A) and SIRT2 (Fig. 1B). The time course of the deacetylation of Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub> to yield Fmoc-KKL-NH<sub>2</sub> and the concomitant formation of nicotinamide is shown in Fig. 2. 2'-O-Acetyl-ADP-ribose as another product could not be detected in the current assay because it migrates as an anionic compound to the anode while the detector is set at the cathodic end of the capillary for detection of the positively charged peptides. In the presence of SIRT1, the acetylated peptide disappeared rapidly with the concomitant formation of Fmoc-KKL-NH<sub>2</sub> and nicotinamide. In the absence of the enzyme or the cofactor NAD<sup>+</sup>, conversion of the substrate was not observed. Comparable behavior was observed for Fmoc-KK(Ac)-NH<sub>2</sub> and Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub> (data not shown).

The Fmoc-labeled peptides were demonstrated to be effective substrates of SIRT1. After an incubation period of 1 h, 90.7, 94.3, and 87.6% of Fmoc-KK(Ac)-NH<sub>2</sub>, Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub>, and Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub>, respectively, had reacted using an enzyme activity of 2.5 U/100  $\mu$ l, and within 2 h the compounds were completely converted. In contrast, substrate conversion by SIRT2 was rather slow. For example, after 3 h only 26.1, 17.8, and 14.4% of Fmoc-





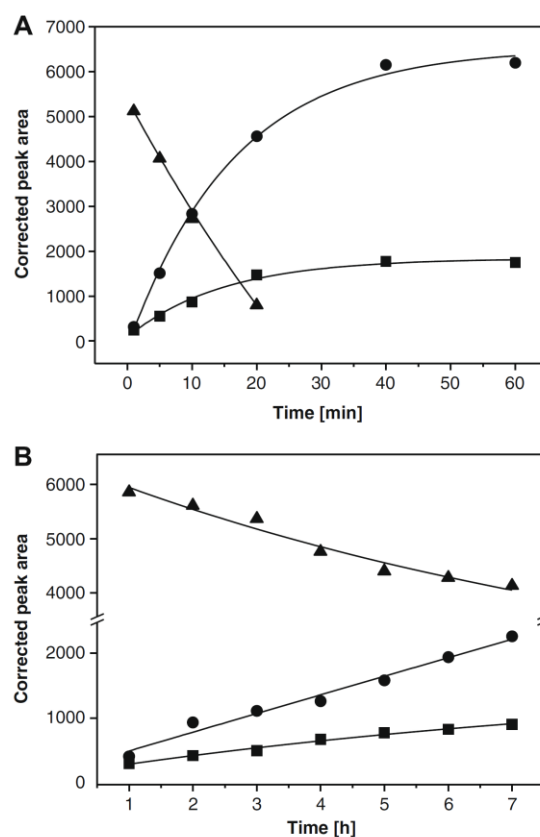
**Fig. 1.** Electropherograms following the time course of the deacetylation of Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub> by SIRT1 (A) and SIRT2 (B). CE conditions: 30/37 cm fused-silica capillary, 50  $\mu$ m ID, 200 mM phosphate-Tris buffer (pH 2.7), 20 kV, 25  $^{\circ}$ C, detection at 220 nm, sample injection of 0.5 psi for 10 s following 20 s of 0.2 M NaOH.

KK(Ac)-NH<sub>2</sub>, Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub>, and Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub>, respectively, had been converted despite the fact that a higher enzyme activity of 5 U/100  $\mu$ l SIRT2 was used. Less than 50% was deacetylated within a period of 7 h under the experimental conditions applied. Differences in the catalytic efficiency of sirtuin enzymes [9,16] or binding strength between enzyme and substrate [17], depending on the amino acid sequence of the peptide substrates, have been reported, and this is also the most likely explanation for the differences in conversion rates of the Fmoc-labeled peptides by SIRT1 and SIRT2.

#### Enzyme kinetics

To further characterize the Fmoc-labeled peptides as substrates for SIRT1 and SIRT2, the respective Michaelis-Menten kinetics were determined. Fig. 3 shows the dependence of the deacetylation reaction initial velocity,  $v_0$ , on the substrate concentration. The kinetic data—the Michaelis constant ( $K_m$ ), the maximum velocity ( $V_m$ ), the turnover number ( $k_{cat}$ ) and the specificity constant ( $k_{cat}/K_m$ )—are listed in Table 1.

The  $K_m$  values obtained for the Fmoc-labeled peptide substrates with SIRT1 and SIRT2 are in the order of magnitude of values reported for long peptide substrates such as fluorescein-labeled 22- or 23mer peptides ( $K_m = 11.9 \mu$ M) [15], Fmoc-labeled 16mer peptides ( $K_m = 57\text{--}87 \mu$ M) [20], and 9- to 20mer peptides [7] but are somewhat smaller compared with C-terminal AMC-labeled pep-



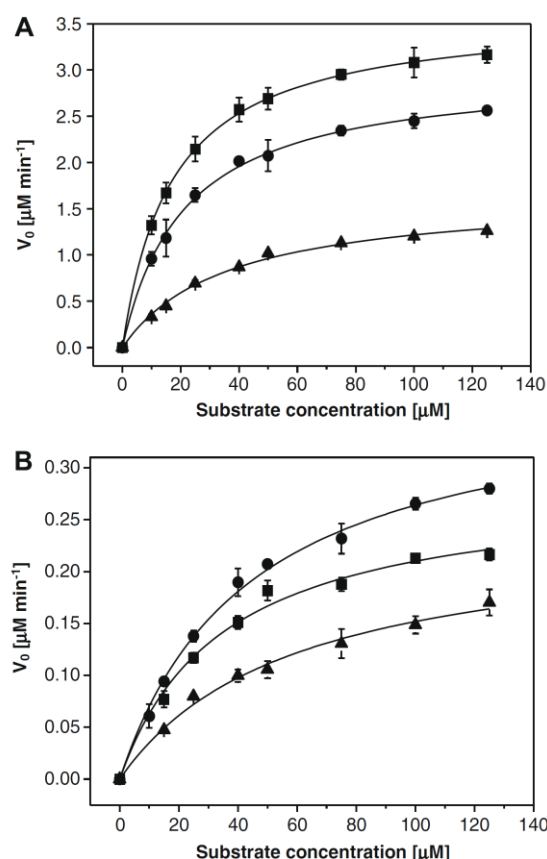
**Fig. 2.** Time-dependent formation of Fmoc-KKL-NH<sub>2</sub> and nicotinamide on incubation of 100  $\mu$ M Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub> in the presence of 2.5 U/100  $\mu$ l SIRT1 (A) and 5 U/100  $\mu$ l SIRT2 (B).  $\blacktriangle$ , Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub>;  $\bullet$ , Fmoc-KKL-NH<sub>2</sub>;  $\blacksquare$ , nicotinamide.

tides such as the commercial Fluor-de-Lys SIRT1 substrate ( $K_m = 108 \mu$ M) [21]. The minor differences between the new short Fmoc-labeled peptides and long peptide substrates that are either unlabeled [7] or labeled at the N terminus [15,20] indicate that such a label might not significantly affect substrate conversion even if the label is very close to acetyl-lysine at the reaction site. It has also been reported that peptide deacetylation by SIRT1 displays only little sequence specificity [20].

The  $k_{cat}/K_m$  values representing the catalytic efficiency of the enzyme toward the substrates (Table 1) are also in the range of values reported for other peptide substrates [7,17]. The tetrapeptide Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub> appears to be the least effective substrate for both sirtuins, whereas Fmoc-KK(Ac)-NH<sub>2</sub> was most effective in the case of SIRT1 and Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub> was preferred by SIRT2. SIRT1 displayed a 5- to 10-fold higher catalytic efficiency for the Fmoc-labeled peptides compared with SIRT2. Nevertheless, the small Fmoc-labeled peptides proved to be substrates for both enzymes, indicating that small molecules may also serve as alternative substrates for sirtuins compared with large peptides or recombinant proteins.

#### Effect of resveratrol on substrate deacetylation by SIRT1

The activation of SIRT1 by resveratrol [9] has attracted attention because this may be related to the enhancement of SIRT1-depen-



**Fig. 3.** Enzyme kinetic data of SIRT1 (A) and SIRT2 (B) deacetylation of Fmoc-KK(Ac)-NH<sub>2</sub>, Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub>, and Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub>. Each data point is the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). ■, Fmoc-KK(Ac)-NH<sub>2</sub>; ●, Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub>; ▲, Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub>.

**Table 1**  
Kinetic parameters for SIRT1 and SIRT2 deacetylation of Fmoc-KK(Ac)-NH<sub>2</sub>, Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub>, and Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub>.

	Fmoc-KK(Ac)-NH <sub>2</sub>	Fmoc-KK(Ac)L-NH <sub>2</sub>	Fmoc-RHKK(Ac)-NH <sub>2</sub>
<b>SIRT1</b>			
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$16.7 \pm 0.5$	$19.7 \pm 1.1$	$34.6 \pm 3.2$
$V_m$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	$3.6 \pm 0.1$	$2.9 \pm 0.1$	$1.6 \pm 0.5$
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$0.60 \pm 0.01$	$0.49 \pm 0.01$	$0.27 \pm 0.08$
$k_{cat}/K_m$ ( $\times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$35.9 \pm 1.1$	$24.9 \pm 1.4$	$7.9 \pm 0.7$
<b>SIRT2</b>			
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$34.7 \pm 4.5$	$41.6 \pm 6.0$	$58.6 \pm 7.9$
$V_m$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	$0.28 \pm 0.01$	$0.37 \pm 0.02$	$0.24 \pm 0.02$
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$0.11 \pm 0.01$	$0.14 \pm 0.01$	$0.09 \pm 0.01$
$k_{cat}/K_m$ ( $\times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$3.1 \pm 0.4$	$3.5 \pm 0.5$	$1.6 \pm 0.2$

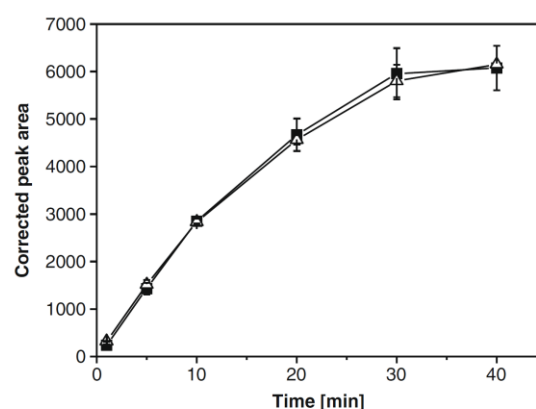
Note. Values are the means  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ).

dent cellular processes such as increasing life span and resistance to apoptosis and reducing adipogenesis in fat-producing cells [22]. An up to ninefold increase of the SIRT1-mediated in vitro deacetylation reaction by resveratrol has been reported [10,14].

However, no activation effect of resveratrol could be observed for either of the Fmoc-labeled peptide substrates using concentrations of up to 500  $\mu\text{M}$  of the compound, as illustrated in Fig. 4 for the tripeptide Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub> at a resveratrol concentration of 200  $\mu\text{M}$ . In general, it has been observed that in vitro SIRT1 activation by resveratrol is highly dependent on the nature of the substrate. Although activation was observed for C-terminal AMC-labeled peptides [5,9,10,14], no effect was found when acetylated histone H3 [10] or 19- or 20mer peptides [5] were used as substrates. It was concluded from kinetic data that the C-terminal fluorophore label decreased binding affinity of the substrate to SIRT1. In contrast, in the presence of resveratrol, the AMC-labeled peptide was bound more tightly, leading to increased turnover [5,10]. Thus, the binding affinity of N-terminal-labeled peptides does not appear to be affected by resveratrol as is the case for large peptides or proteins. The reason for the effect of a fluorophore on either the C or N terminus on SIRT1 activation by resveratrol is currently not clear and will require further studies employing different substrates and fluorescent labels.

#### Evaluation of inhibitors of SIRT1 and SIRT2

The Fmoc-labeled peptide substrates were further evaluated for their use in the determination of sirtuin inhibitors. Sirtinol, a well-documented inhibitor of sirtuin enzymes [23], effectively inhibited both SIRT1 and SIRT2 in the CE assay. In the presence of 100  $\mu\text{M}$  sirtinol, the SIRT1-catalyzed deacetylation was inhibited at least 90%. The  $\text{IC}_{50}$  values and inhibition constants ( $K_i$ ) of sirtinol determined with the three Fmoc-labeled peptides are summarized in Table 2. Differences within this group of substrates are only minor.



**Fig. 4.** Effect of resveratrol on the SIRT1-mediated deacetylation of Fmoc-KK(Ac)L-NH<sub>2</sub>. Each data point is the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ).  $\Delta$ , without resveratrol;  $\blacksquare$ , 200  $\mu\text{M}$  resveratrol.

**Table 2**  
 $\text{IC}_{50}$  and  $K_i$  values of SIRT1 and SIRT2 inhibition by sirtinol as determined using Fmoc-labeled peptides as substrates.

	Fmoc-KK(Ac)-NH <sub>2</sub>	Fmoc-KK(Ac)L-NH <sub>2</sub>	Fmoc-RHKK(Ac)-NH <sub>2</sub>
<b>SIRT1</b>			
$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$36.3 \pm 1.2$	$42.5 \pm 6.6$	$35.0 \pm 4.8$
$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$5.2 \pm 0.2$	$7.0 \pm 1.1$	$9.0 \pm 1.2$
<b>SIRT2</b>			
$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$118.6 \pm 6.6$	$95.8 \pm 8.4$	$90.0 \pm 3.3$
$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$30.6 \pm 1.7$	$28.1 \pm 2.5$	$33.3 \pm 1.2$

Note. Values are the means  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ).

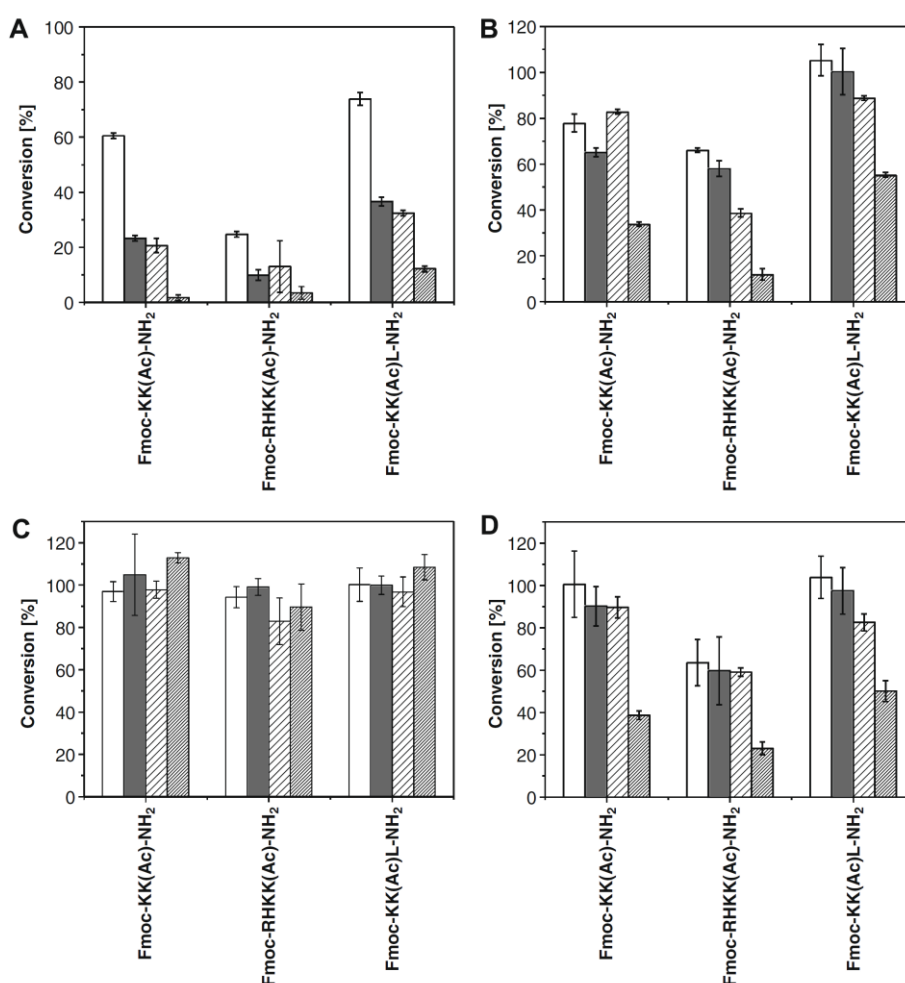


These  $IC_{50}$  values are lower by a factor of 1.5 to 3.0 compared with the  $IC_{50}$  value determined using Z-MAL [11,24] or a histone protein as substrate [25].

Sirtinol proved to be a less effective inhibitor of SIRT2 using the Fmoc-labeled peptides as substrates in the CE assay. In the presence of 100  $\mu$ M sirtinol, inhibition was less than 66%. The  $IC_{50}$  and  $K_i$  values are listed in Table 2. The  $IC_{50}$  values are two to three times higher compared with literature data [11,25,26]. Moreover, in these reported assays, sirtinol was a more effective inhibitor of SIRT2 than SIRT1, whereas the reversed order was observed in the current CE assay employing small Fmoc-labeled peptides as substrates. This difference might originate in the different experimental protocol but indicates that comparison of inhibition specificity should be interpreted with care considering the applied assay and substrate.

Four other inhibitors—the two bisindolylmaleimides Ro 31-8220 and GF 109203X [26] and the two splitomicin derivatives 8-bromo- $\alpha$ -phenylsplitomicin and 8-bromo- $\beta$ -phenylsplitomicin [27]—were

evaluated at 10 and 50  $\mu$ M concentrations. The remaining enzymatic activity of SIRT1 and SIRT2 as a percentage of conversion under such incubation conditions is summarized in Fig. 5. The extent of enzyme inhibition varied with the Fmoc-labeled peptide substrate. Because Ro 31-8220 was the most effective inhibitor of the four tested compounds, it was also tested at 0.5 and 2.0  $\mu$ M concentrations using Fmoc-RHKK(Ac)-NH<sub>2</sub> as substrate. For SIRT1, 88.8  $\pm$  1.6 and 67.1  $\pm$  6.3% conversion were observed at 0.5- and 2.0- $\mu$ M concentrations of the inhibitor, respectively. In the case of SIRT2, 57.9  $\pm$  9.7 and 17.9  $\pm$  2.4% conversion resulted. Thus, Ro 31-8220 is a more effective inhibitor for SIRT2 compared with SIRT1, as was also reported using Z-MAL as substrate [26]. The  $IC_{50}$  of Ro 31-8220 for SIRT2 can be estimated at low micromolar ( $\mu$ M) levels from these data. Contradictory variations or no inhibitory activity was observed in experiments using 8-bromo- $\alpha$ -phenylsplitomicin and 8-bromo- $\beta$ -phenylsplitomicin, although activity has been reported using another assay procedure [27]. This may be explained by the low aqueous solubility of both compounds.



**Fig. 5.** Inhibition of SIRT1 and SIRT2 by Ro 31-8220 (A), GF 109203X (B), 8-bromo- $\alpha$ -phenylsplitomicin (C), and 8-bromo- $\beta$ -phenylsplitomicin (D) expressed as percentage substrate conversion in the presence and absence of the inhibitors. Each data point is the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Open bars: SIRT1, inhibitor concentration 10  $\mu$ M; filled bars: SIRT1, inhibitor concentration 50  $\mu$ M; lightly hatched bars: SIRT2, inhibitor concentration 10  $\mu$ M; closely hatched bars: SIRT2, inhibitor concentration 50  $\mu$ M.

## Conclusions

Three short Fmoc-labeled acetyl-lysine peptides based on the amino acid sequence of p53 were evaluated as substrates for two of the human sirtuin enzymes: SIRT1 and SIRT2. Deacetylation was monitored by a validated CE method. Enzyme kinetic data were essentially comparable to reported values, with the catalytic efficiency of SIRT1 toward the substrates being higher compared with SIRT2. This clearly shows that small molecules such as dipeptides are also able to interact with sirtuins efficiently. Activation of SIRT1 by resveratrol as described for peptide substrates labeled with AMC at the C terminus could not be observed for the Fmoc-labeled peptides, indicating that (fluorophore) substituents close to the acetyl-lysine may influence the activation process. Further studies that include substrates differing in the amino acid sequences and/or nature of the fluorescent label will be necessary to obtain a better understanding of the possible activation of SIRT1. Inhibition of SIRT1 and SIRT2 by documented inhibitors was also shown in the current assay. However, in contrast to published data, sirtinol inhibited SIRT1 more effectively than SIRT2 in the current CE assay employing small Fmoc-labeled peptides as substrates. Thus, comparison of inhibition data should be interpreted with care considering assay methodology and/or employed substrates. Although not tested here, the Fmoc-labeled peptides can also be expected to serve as substrates for zinc-dependent, trichostatin A-sensitive histone deacetylases (classes I and II) that also deacetylate peptides containing the KK(Ac) motif such as p53 as well as sirtuin substrates [11,12], including the commercial Flour-de-Lys substrate [28].

## Acknowledgments

The financial support of Yi Fan by the Alexander von Humboldt Foundation (Bonn, Germany) is gratefully acknowledged. The authors thank Manfred Jung (University of Freiburg, Germany) for the gift of inhibitors.

## References

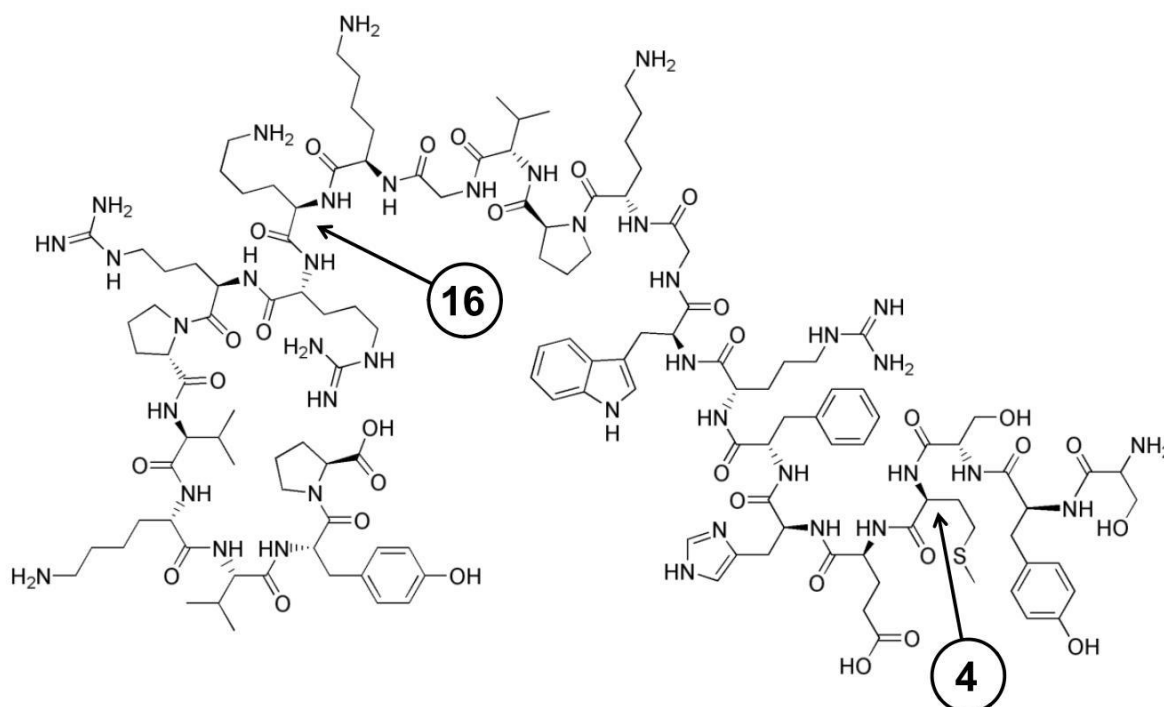
- [1] K.G. Tanner, J. Landry, R. Sternglanz, J.M. Denu, Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 14178–14182.
- [2] M.C. Haigis, L.P. Guarente, Mammalian sirtuins: emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction, *Gene Dev.* 20 (2006) 2913–2921.
- [3] S. Michan, D. Sinclair, Sirtuins in mammals: insights into their biological function, *Biochem. J.* 404 (2007) 1–13.
- [4] B.C. Smith, J.M. Denu, Acetyl-lysine analog peptides as mechanistic probes of protein deacetylases, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 37256–37265.
- [5] M. Kaerberlein, T. McDonagh, B. Heltweg, J. Hixon, E.A. Westman, S.D. Caldwell, A. Napper, R. Curtis, P.S. DiStefano, S. Fields, A. Bedalov, B.K. Kennedy, Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 17038–17045.
- [6] M.D. Jackson, J.M. Denu, Structural identification of 2'- and 3'-O-acetyl-ADP-ribose as novel metabolites derived from the Sir2 family of  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>-dependent histone/protein deacetylases, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 18535–18544.
- [7] M.T. Borra, M.R. Langer, J.T. Slama, J.M. Denu, Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD<sup>+</sup>-dependent histone/protein deacetylases, *Biochemistry* 43 (2004) 9877–9887.
- [8] M.T. Borra, J.M. Denu, Quantitative assays for characterization of the Sir2 family of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylases, *Methods Enzymol.* 376 (2004) 171–187.
- [9] K.T. Howitz, K.J. Bitterman, H.Y. Cohen, D.W. Lamming, S. Lavu, J.C. Wood, R.E. Zipkin, P. Chung, A. Kisielewski, L.-L. Zhang, B. Scherer, D.A. Sinclair, Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan, *Nature* 425 (2003) 191–196.
- [10] M.T. Borra, B.C. Smith, J.M. Denu, Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 17187–17195.
- [11] B. Heltweg, F. Dequiedt, E. Verdin, M. Jung, Nonisotopic substrate for assaying both human zinc and NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases, *Anal. Biochem.* 319 (2003) 42–48.
- [12] B. Heltweg, J. Trapp, M. Jung, In vitro assays for the determination of histone deacetylase activity, *Methods* 36 (2005) 332–337.
- [13] P.A. Marcotte, P.R. Richardson, J. Guo, L.W. Barrett, N. Xu, A. Gunasekera, K.B. Glaser, Fluorescence assay of SIRT protein deacetylases using an acetylated peptide substrate and a secondary trypsin reaction, *Anal. Biochem.* 332 (2004) 90–99.
- [14] V.C.J. de Boer, M.C. de Goffau, I.C.W. Arts, P.C.H. Hollman, J. Keijer, SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism, *Mech. Aging Dev.* 127 (2006) 618–627.
- [15] Y. Liu, R. Gerber, J. Wu, T. Tsuruda, J.D. McCarter, High-throughput assays for sirtuin enzymes: a microfluidic mobility shift assay and a bioluminescence assay, *Anal. Biochem.* 378 (2008) 53–59.
- [16] M.S. Cosgrove, K. Bever, J.L. Avalos, S. Muhammad, X.B. Zhang, C. Wolberger, The structural basis of sirtuin substrate affinity, *Biochemistry* 45 (2006) 7511–7521.
- [17] A.L. Garske, J.M. Denu, SIRT1 top 40 hits: use of one-bead, one-compound acetyl-peptide libraries and quantum dots to probe deacetylase specificity, *Biochemistry* 45 (2006) 94–101.
- [18] C. Schlicker, M. Gertz, P. Papatheodorou, B. Kachholz, C.F.W. Becker, C. Steegborn, Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins sirt3 and sirt5, *J. Mol. Biol.* 382 (2008) 790–801.
- [19] Y. Fan, R. Ludewig, D. Imhof, G.K.E. Scriba, Development of a capillary electrophoresis-based assay of sirtuin enzymes, *Electrophoresis* 29 (2008) 3717–3723.
- [20] G. Blander, J. Olejnik, E. Krzymanska-Olejnik, T. McDonagh, M. Haigis, M.B. Yaffier, L. Guarente, SIRT1 shows no substrate specificity in vitro, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 9780–9785.
- [21] BIOMOL International, Product data sheet of Fluor de Lys–SIRT1, fluorogenic deacetylase substrate KI-104, <http://www.biomol.com/SiteData/docs/productdata/KI177.pdf>.
- [22] A.A. Sauve, C. Wolberger, V.L. Schramm, J.D. Boeke, The biochemistry of sirtuins, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 435–465.
- [23] C.M. Grozinger, E.D. Chao, H.E. Blackwell, D. Moazed, S.L. Schreiber, Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 38837–38843.
- [24] J. Trapp, R. Meier, D. Hongwiset, M.U. Kassack, W. Sippl, M. Jung, Structure–activity studies on suramin analogues as inhibitors of NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases (Sirtuins), *ChemMedChem* 2 (2007) 1419–1431.
- [25] A. Mai, S. Massa, S. Lavu, R. Pezzi, S. Simeoni, R. Ragno, F.R. Mariotti, F. Chiani, G. Camilloni, D.A. Sinclair, Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (sirtuin) inhibitors, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 7789–7795.
- [26] J. Trapp, A. Jochum, R. Meier, L. Saunders, B. Marshall, C. Kunick, E. Verdin, P. Goekjian, W. Sippl, M. Jung, Adenosine mimetics as inhibitors of NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases, from kinase to sirtuin inhibition, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 7307–7316.
- [27] R.C. Neugebauer, U. Uchieschowska, R. Meier, H. Hruby, V. Valkov, E. Verdin, W. Sippl, M. Jung, Structure–activity studies on splitomicin derivatives as sirtuin inhibitors and computational prediction of binding mode, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 1203–1213.
- [28] BIOMOL International, Product data sheet of HDAC fluorimetric assay/drug discovery kit–AK-500, <http://www.biomol.com/SiteData/docs/productdata/ak500.pdf>.

## 4 Bisher unveröffentlichte Ergebnisse

### *Tetracosactid und Untersuchungen zur Reinheit*

Beim Tetracosactid (Synonym: Synacthen, AAC: SYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYP) handelt es sich um ein synthetisches ACTH-Analogon, welches im Gegensatz zum ACTH mit 39 Aminosäuren nur aus den ersten 24 Aminosäuren besteht (Abbildung 4).

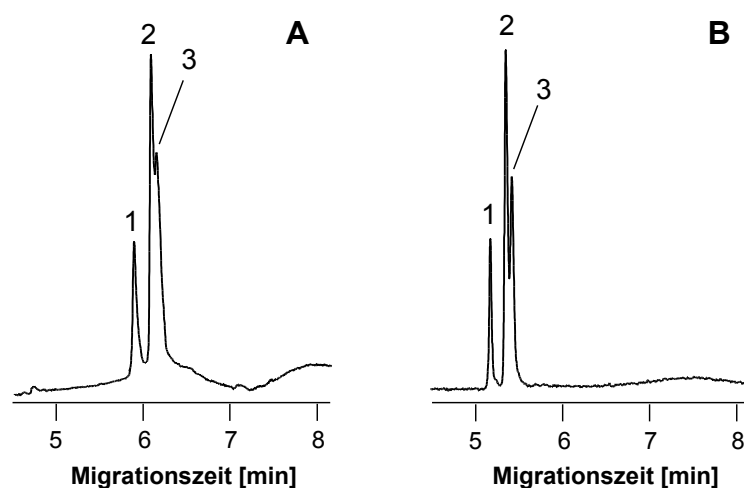
Tetracosactid ist im Europäischen Arzneibuch monographiert. Bei der Prüfung auf verwandte Substanzen wird eine HPLC durchgeführt, wobei bisher nur zwei Verunreinigungen aufgenommen worden sind<sup>[11]</sup>. In Position 4 befindet sich ein Methionin, das als Sulfoxid (SO-Met) vorliegen kann (*impurity A*). Bei der zweiten Verunreinigung (*impurity B*) handelt es sich vermutlich um ein Diastereomer des Tetracosactids, bei dem in Position 16 ein D-Lysin, statt der natürlich vorkommenden L-Form eingebaut ist (Abbildung 4). Die Trennung der Diastereomere Tetracosactid und D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactid mittels CEC ist im Manuskript 1 beschrieben. Weiterhin wurden verschiedene Tetracosactid-Chargen auf mögliche Verunreinigungen mit den analytischen Methoden CZE resp. CE-ESI-MS untersucht.



**Abbildung 4.** Struktur des L-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactids, abgeleitet vom natürlich vorkommenden ACTH.

**Tetracosactid-Analytik mittels CZE-UV**

Tetracosactid enthält genau acht basische Aminosäuren. Der isoelektrische Punkt (pI) des ACTH liegt bei 10,5<sup>[105]</sup>, wonach ab einem pH-Wert von 9,0 das Peptid positiv geladen vorliegt. Zur Analytik des Tetracosactids mittels CZE wurde ein saurer Phosphatpuffer genutzt, damit alle eventuell vorhandenen Verunreinigungen und das Tetracosactid protoniert vorliegen. Aufgrund der Kettenlänge von 24 Aminosäuren kommt es in der Kapillare zur Oberflächenadsorption, was zu einer hohen Peakbreite führt (Abbildung 5 A). Um die Signalbreite gering zu halten, wurde für ein dynamisches Coating dem Phosphatpuffer Diethylentriamin zugesetzt. Durch Optimierung traten eine Verbesserung der Trennung und eine Erhöhung der Peakschärfe ein (Abbildung 5 B). Dennoch konnte keine vollständige Trennung des Sulfoxids vom Tetracosactid erreicht werden.



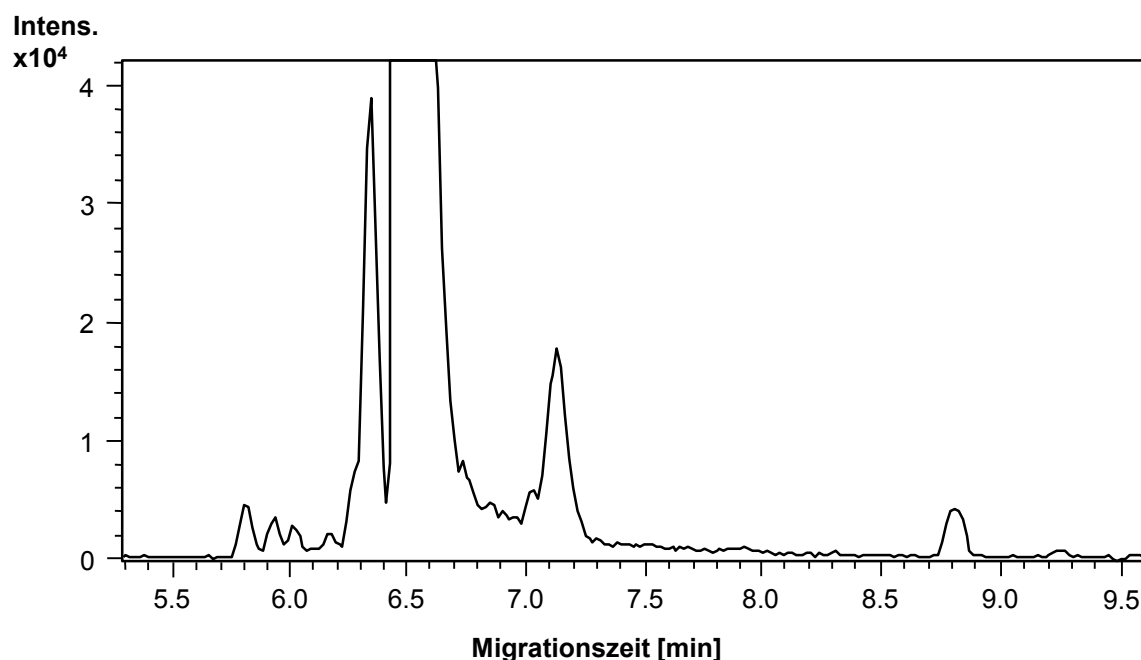
**Abbildung 5.** CZE-Analytik von Tetracosactid (2) und zwei potentiellen Verunreinigungen.

(1= D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactid, 3 = Tetracosactid-Sulfoxid); Messbedingungen: **A:** Phosphatpuffer 100 mM, pH 2,5; **B:** Phosphatpuffer 100 mM, + Diethylentriamin 80 mM, pH 2,5;

weitere Bedingungen: unbehandelte Quarzkapillare, 30/37 cm, 50 µm I.D., Spannung: 15 kV

**Tetracosactid-Analytik mittels CZE-MS**

Um genauere Aussagen zur Qualität von Tetracosactid-Chargen zu treffen wurden Messungen mittels CZE-ESI-MS durchgeführt. Die Abbildung 6 zeigt den Gesamtionenstrom einer Tetracosactid-Charge nach CZE-MS-Messung. Durch die Verwendung eines 0,5 M Formiatpuffers konnte das D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactid (Migrationszeit 6,3 min) vom Hauptpeak (Migrationszeit 6,6 min) getrennt werden. Das Sulfoxid wies jedoch die gleiche Migrationszeit wie die Hauptkomponente auf. Weitere Substanzen mit Migrationszeiten von 5,8 bis 7,1 min sowie 8,8 min wurden detektiert. Durch Extraktion der einzelnen Ionenspuren, welche sich aus dem Masse-Ladungs-Verhältnis im ESI-MS ergeben, erhält man die in Abbildung 7 dargestellten Elektropherogramme. Insgesamt wurden mit dieser Methode 16 Peptid-Fragmente ermittelt. Die erhaltenen Massenspektren wiesen die Signale in Form von  $[M_r+3H]^{3+}$  auf, welche anschließend durch Ladungsentfaltung den Fragmenten zugeordnet werden konnten. Bei diesen Fragmenten handelt es sich um Verunreinigungen aus der Peptidsynthese, was an der jeweiligen Verkürzung um eine Aminosäure zu erkennen ist. Die mit X bezeichneten Signale stammen aus der Fragmentierung der Hauptschubstanz während der CZE-ESI-MS-Messungen. Das erste Fragment in Abbildung 7, welches eine Retentionszeit von 8,8 min aufweist, ist vermutlich durch Spaltung zwischen Gly<sup>14</sup> und Lys<sup>15</sup> entstanden, kann aber auch ein Nebenprodukt der Festphasenpeptidsynthese sein.

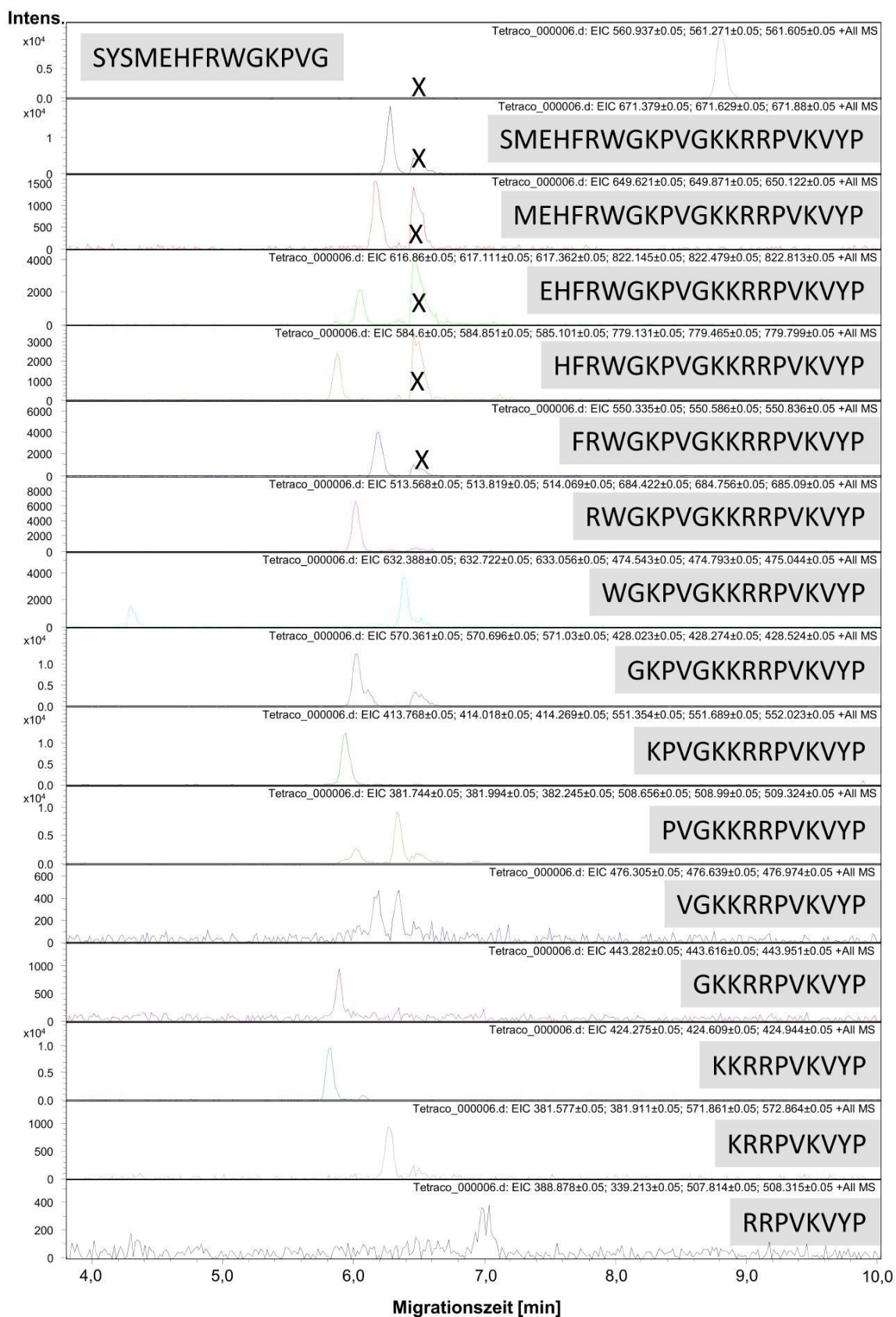


**Abbildung 6.** Elektropherogramm des vollständigen Ionenstroms der CZE-ESI-MS-Messung einer Tetracosactid-Charge.

**CZE:** unbehandelte Quarzkapillare, 50/62 cm, 50  $\mu$ m I.D.; 0,5 M Formiat-Puffer, pH 2,0; Spannung 15 kV;

**ESI-TOF-MS:** micrOTOFQ (Bruker Daltonik), Sheath-Liquid: Isopropanol/Wasser 50/50 mit 0,2 % HCOOH





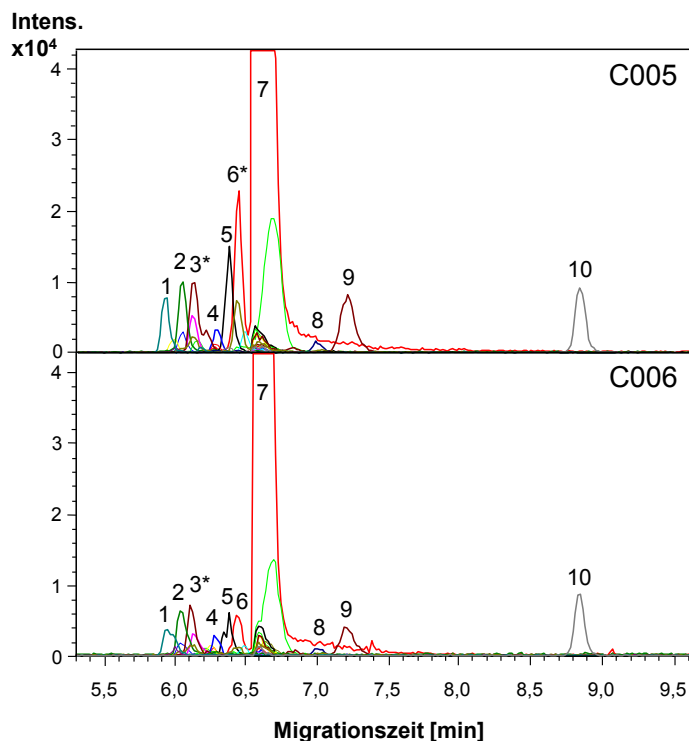
**Abbildung 7.** Elektropherogramme der durch CZE-ESI-MS erhaltenen Ionenspuren mit gleichzeitiger Darstellung der Peptid-Fragmente einer Tetracosactid-Charge (C005).

X = Fragmentierung des Hauptpeaks

Für den Vergleich zweier Tetracosactid-Chargen auf Verunreinigungen wurden neben dem Diastereomer (Peak-Nr. 6) die acht Fragmente mit den größten Signalstärken für die Auswertung betrachtet (Tabelle 3). Da in der CZE eine Trennung nach Masse-Ladungs-Verhältnis erfolgt, kommt es zur Co-Migration einzelner Fragmente (mit \* bezeichnet). Ein kleineres Peptid kann durch geringere positive Ladung eine kleinere Mobilität aufweisen als ein größeres Peptid höherer Ladung. Da die Anzahl der basischen Aminosäuren (Tabelle 3) in einem sauren Formiat-Puffer mit der Zahl der positiven Ladungen korreliert, werden einige Peptid-Fragmente (Peak-Nr. 8-10) erst nach dem Tetracosactid detektiert. Der Vergleich zweier Chargen des Tetracosactids, in denen die Massenspuren farblich hervorgehoben sind, zeigen deutliche Unterschiede in den Elektropherogrammen in Abbildung 8. Während die Charge C006 weniger D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactid und andere Fragmente enthält als die Charge C005, weisen beide Proben etwa dieselbe Konzentration an SYSMEHFRWGKPVG (Peak-Nr. 10) auf.

**Tabelle 3.** Zuordnung der ermittelten Massen zu den Peptid-Fragmenten resp. Signalen der Abbildung 8.\*Co-Migration ermittelter Fragmente; \*\*D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactid

Peak-Nr.	Ermittelte Masse (M <sub>r</sub> )	Aminosäure-Sequenz	Anzahl der Aminosäuren (basischen Aminosäuren)
1	1269,8034	KKRRPVKVYP	10 (5)
2	1651,0410	KPVGKKRRPVKVYP	14 (6)
3*	1708,0624	GKPVGKKRRPVKVYP	15 (6)
3*	2050,2429	RWGKPVGKKRRPVKVYP	17 (7)
4	2197,3113	FRWGKPVGKKRRPVKVYP	18 (7)
5	2681,4853	SMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYP	22 (8)
6*	2933,5743	**SYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYP	24 (8)
6*	1522,9460	PVGKKRRPVKVYP	13 (5)
7	2933,5743	SYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYP	24 (8)
8	1425,8932	VGKKRRPVKVYP	12 (5)
9	1013,6134	RRPVKVYP	8 (3)
10	1679,7878	SYSMEHFRWGKPVG	14 (3)

**Abbildung 8.** Elektropherogramme der extrahierten Ionenspur zum Vergleich der Chargen C005 und C006 des Tetracosactids, normiert auf 10 % des Hauptpeaks. Zuordnung der Signale siehe Tabelle 3; Messbedingungen: siehe Abbildung 6; \*Co-Migration betrachteter Fragmente, farbige Signale unter der Fläche des Hauptpeaks (7) stammen aus der Fragmentierung des Tetracosactids bei der MS-Messung



## 5 Gesamtdiskussion

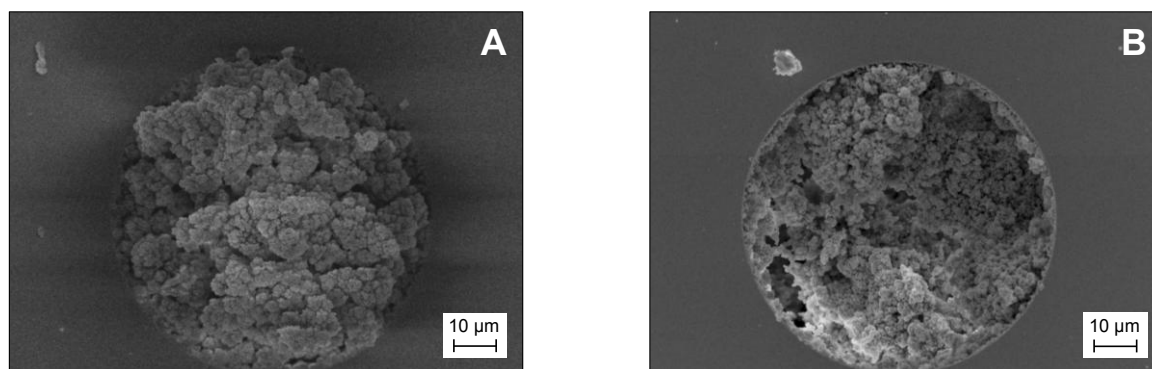
In der vorliegenden Arbeit wurde als Schwerpunkt die Trennung von Peptiden mit Hilfe der Elektromigrationsverfahren CZE und CEC untersucht. Dabei wurden im Bereich der CEC verschiedene Monolith-Kapillaren in Form von RP, SCX und WCX hergestellt und auf ihre Trennleistung von diastereomeren Peptiden geprüft (Manuskript 1, Manuskript 2). Für die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse wurden die Retentionszeiten von Di- und Tripeptiden verglichen, welche mit dem WCX-Monolithen ermittelt wurden. Neben der Verwendung der gleichen Kapillare wurde die Wiederholbarkeit der Polymerisierung untersucht (Manuskript 2). Für die Monolith-Kapillaren RP und WCX wurden zur Ermittlung der Abhängigkeit der mobilen Phase von der Trennung diastereomerer Peptide der Acetonitril-Anteil, die Pufferkonzentration der mobilen Phase und der pH-Wert variiert und jeweils optimiert. Zur Anwendung der Elektromigrationsverfahren wurde das ACTH-Analogon Tetracosactid auf Verunreinigungen untersucht (unveröffentlichte Ergebnisse) sowie ein Enzymassay für Sirtuine mit Peptidsubstraten entwickelt (Manuskript 3, Manuskript 4). Sirtuin-Inhibitoren verschiedener Strukturklassen wurden an den Enzymen *SIRT1* und *SIRT2* getestet.

### 5.1 Einfluss stationärer Phasen auf die Trenneffizienz in der CEC

#### 5.1.1 Synthese und Charakterisierung der Monolithe

Für die Trennung von Peptiden mittels CEC wurden die zwei strukturell unterschiedlichen Monolithen RP und WCX auf der Basis von Laurylacrylat resp. Acrylamidobenzoessäure hergestellt. Die benötigten Monomere und der Reaktionskatalysator AIBN wurden jeweils in einem binären Porogen gelöst und in die mit Acrylsilylethern vorbehandelten Kapillaren gefüllt. Die Polymerisierung fand unter Wärmeeinwirkung bei 60 °C statt. Unter anschließender Spülung wurden die Kapillaren von überschüssigen Reagenzien befreit und mit der mobilen Phase equilibriert.

Zur Charakterisierung der Monolithe wurden Elektronenmikroskopaufnahmen der Querschnitte von RP- und WCX-Monolithen erzeugt. Bei der Betrachtung der Aufnahmen in Abbildung 9 lässt sich bei dem RP-Monolith (A) ein dichter gepacktes Polymer gegenüber dem WCX-Monolith (B) erkennen.

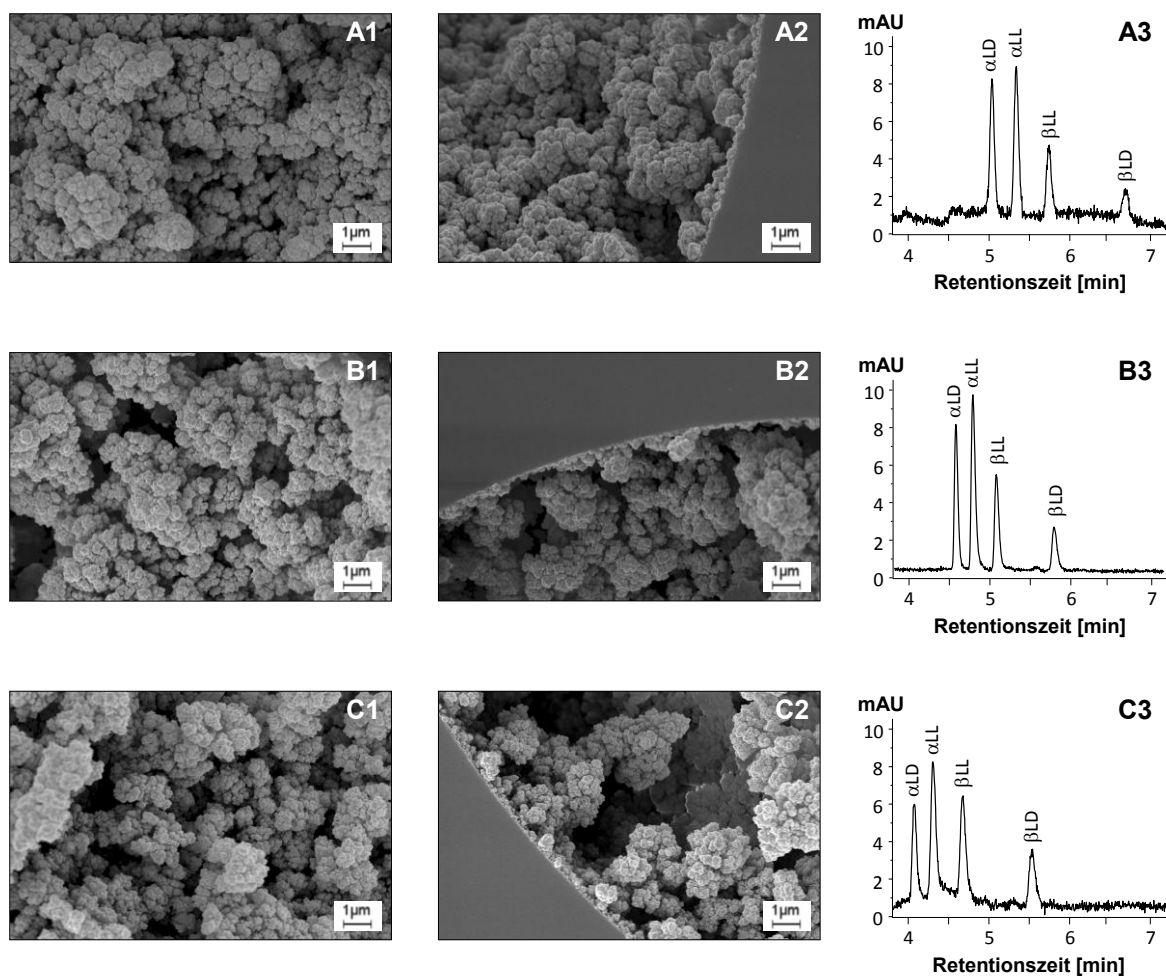


**Abbildung 9.** SEM-Aufnahmen der Querschnitte eines (A) RP- und (B) WCX-Monolithen.

Die Morphologie eines Monolithen ist einer der Schlüsselfaktoren, welche das Trennungsvermögen der Monolith-Kapillare beeinflussen. Um eine hohe Effizienz zu erhalten, ist Homogenität und Rigidität des Polymers notwendig<sup>[106]</sup>. Bei Kapillaren, die mit mikrosphärischen Feststoffpartikeln gepackt sind, ist eine größere Trenneffizienz bei kleiner Partikelgröße zu erwarten<sup>[107]</sup>. Mit der Herstellung von Monolith-Kapillaren ist nicht mehr die Partikelgröße, sondern die Porengröße von entscheidender Bedeutung für die Trennung. Diese kann durch Veränderungen im Porogenanteil beeinflusst werden. Durch Erhöhung des Anteils von 1-Propanol von 59 % auf 61 % in einem ternären Porogengemisch stellten Peters et.al eine Veränderung der Durchschnittsgröße der Poren von 1 µm auf 0,4 µm fest<sup>[108]</sup>. Diese geringere Durchschnittsporengröße führte zu kleineren Bodenhöhen und damit zu einer erhöhten Effizienz bei der Trennung von aromatischen Kohlenwasserstoffen. Große Poren zeichnen sich durch eine schnelle, aber ineffiziente Trennung aus. Die dadurch hervorgerufene sehr kleine Oberfläche reicht für eine starke Retention der Analyten nicht aus<sup>[109]</sup>. Lämmerhöfer et.al stellten bei einem erhöhten Anteil an Dodecanol in einem binären Porogengemisch ebenfalls eine Erhöhung der mittleren Porengröße fest, was ebenfalls zu einer schlechteren Trenneffizienz von racemischen N-3,5-Dinitrobenzoylleucin führte<sup>[110]</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Porogenanteils auf die Trenneffizienz von isomeren Tripeptiden ermittelt. Dazu wurden zur Polymerisierung von WCX-Kapillaren drei verschiedene Monomermischungen mit unterschiedlichem Anteil an Porogen hergestellt (Manuskript 2). Von allen drei Monolith-Kapillaren wurden Elektronenmikroskopaufnahmen erstellt. Diese Aufnahmen zeigen eine unterschiedliche Polymerdichte (Abbildung 10). Während Monolith 1 (A1) aufgrund des geringsten Anteils an Porogen ein sehr dicht gepacktes Polymerbett aufweist, besitzen die Monolithe 2 (B1) und 3 (C1) ein deutlich lockeres Polymer und damit größere Poren. Die Aufnahmen A2, B2 und C2 zeigen die Verknüpfung des Polymers zur Innenwand der Kapillare.

Unter gleichen experimentellen Bedingungen wurde die Trennung der Isomere von L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub> auf den drei Monolithen untersucht. Eine geringere Packungsdichte führte zu kürzeren Retentionszeiten (B3, C3). Im Gegensatz dazu ist eine verbesserte Auflösung der Signale bei Verwendung eines kleineren Porogenanteils zu beobachten. Ein dichteres Polymerbett führt zu einer größeren Retention der Analyten (A3).



**Abbildung 10.** Elektronenmikroskopaufnahmen der Mitte (A1-C1) und des Randes (A2-C2) von WCX-Monolithen mit unterschiedlichen Porogenanteilen sowie die Trennung der Isomere von L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub> mittels CEC (A3-C3).

Bei der Verwendung von Monolithen und Vermessung durch CEC können Bodenzahlen von über 200.000 pro Meter Kapillare erreicht werden<sup>[111]</sup>. Für die CEC-Trennung von Dipeptiden, welche Alanin am N-Terminus enthalten, wurden Bodenzahlen von 173.000 und 223.000 pro Meter RP-Monolith-Kapillare erreicht (Manuskript 1). Bei dem WCX-Monolithen wurden für die Trennung von Aspartyl-Tripeptiden Bodenzahlen zwischen 100.000 und 180.000 ermittelt (Manuskript 2). Hilder et al. entwickelten einen zwitterionischen Monolithen, mit dem es gelang, vier Proteine innerhalb von 1,3 Minuten mit einer theoretischen Bodenzahl von 4.000.000 pro Meter zu trennen<sup>[112]</sup>.

### 5.1.2 Präzisionen des WCX-Monolithen

Um grundsätzlich verschiedene Monolithe miteinander zu vergleichen, werden häufig Retentionszeit, Peakfläche, Retentionsfaktoren und Selektivität betrachtet<sup>[113;114]</sup>. Neben der Wiederholbarkeit der analytischen Trennung ist auch die Reproduzierbarkeit der Herstellung entsprechender Monolithe zu gewährleisten. Holdšvendová et al. fanden heraus, dass durch thermische Polymerisation, mit AIBN als Starter, die Reproduzierbarkeit der Produktion eines Methacrylat-Monolithen besser ist als bei Verwendung von Ammoniumperoxodisulfat in Anwesenheit von Tetramethyldiamin (TEMED)<sup>[115]</sup>. Durch Photopolymerisierung wurden bessere Effizienzen in der Trennung als durch thermische Behandlung erreicht. Dennoch konnten Bernabé-Zafón et al. keine Unterschiede in der Reproduzierbarkeit der Art der Polymerisation eines Methacrylat-Monolithen feststellen<sup>[116]</sup>.

In dieser Arbeit wurden die Wiederholpräzision (sechs aufeinanderfolgende Messungen innerhalb kurzer Zeit) sowie die Laborpräzision (jeweils drei Messungen innerhalb von drei aufeinanderfolgenden Tagen). Zur Wiederholbarkeit der Polymerisierung wurden sechs WCX-Monolith-Kapillaren mit der gleichen Monomermischung hergestellt und die Retentionszeiten der Tripeptidisomere Phe-Asp-GlyOH und Phe-Asp-GlyNH<sub>2</sub> verglichen (Manuskript 2). Die Tabelle 4 zeigt die Reproduzierbarkeit des hergestellten WCX-Monolithen gegenüber anderen Monolithen, welche zur Trennung von Peptiden verwendet wurden, wobei jeweils die größte relative Standardabweichung (RSD) angegeben ist. Alle Präzisionen liegen im Bereich der bereits beschriebenen Reproduzierbarkeiten für Monolithe. Die RSD von unter 1 % bei der Wiederholpräzision liegt im Bereich der Trennungen von Kohlenwasserstoffen, die wesentlich einfacher zu handhaben sind als Peptide.

**Tabelle 4.** Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten von Peptiden bei Verwendung verschiedener Monolith-Kapillaren in der CEC.

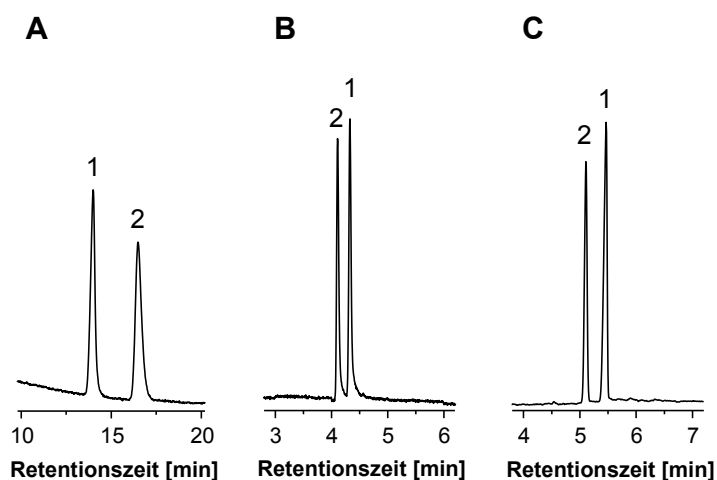
Darstellung der RSD; (1)=N-(2-Acrylamidoethyl)triethylammoniumiodid; (2)=Phosphorsäure-2-hydroxyethyl-methacrylat, Polyethylenglykol-diacrylat; (3)=Reproduzierbarkeiten der Trennung von aromatischen Kohlenwasserstoffen als Vergleich; n=Anzahl der Messungen; n\*=Anzahl der Monolithen

Literatur	Monolith-Basis	RSD (%)		
		Wiederhol- präzision	Laborpräzision	Präzision der Polymerisierung
Ludewig et al. [Manuskript 2]	Acrylamidobuttersäure, Acrylamid	0,69 (n=6)	1,12 (n=3)	4,91 (n*=6)
Koide et al. <sup>[117]</sup>	Allylcarbamoyl- $\beta$ -CD, AAETEI (1), Acrylamid	1,2 (n=6)	1,3 (n=6)	-
Chen et al. <sup>[77]</sup>	PAHEMA-PEGDA (2)	1,99 (n=3)	-	3,66 (n*=3)
Ivanov et al. <sup>[118]</sup>	Glycidyl-methacrylat, Methyl-methacrylat	0,9 (n=3)	1,3 (n=3)	-
Svec et al. <sup>[113]</sup> (3)	Butylmethacrylat	0,18 (n=14)	1,19 (n=3)	3,5 (n*=7)
Palm et al. <sup>[83]</sup> (3)	Acrylamid, Acrylsäure, Butylacrylat	1 (n=6)	2,5 (n=9)	-
Hoegger et al. <sup>[68]</sup> (3)	Piperazin-diacrylamid, Acrylamid	1,34 (n=10)	-	5 (n*=9)

### 5.1.3 Trennungen von Peptiden mit SCX-, WCX- und RP-Monolithen

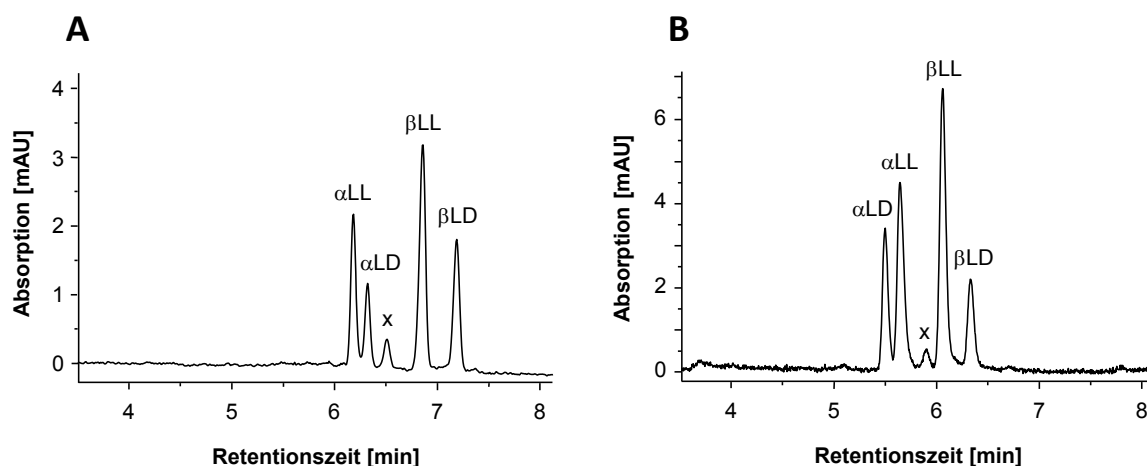
Um Aussagen über die Effizienz von Monolith-Kapillaren zu treffen wurde das Trennverhalten von diastereomeren Peptiden bei Verwendung hydrophiler, ionischer (SCX und WCX) und hydrophober, nichtionischer (RP) stationärer Phasen untersucht. Die Abbildung 11 zeigt die CEC-Trennung der Diastereomere D/L-Ala-L-PheOH bei der Verwendung der drei Monolithe. Bei dem SCX-Monolith weisen die Dipeptide sehr lange Retentionszeiten auf (A), während unter identischen Bedingungen die Trennung mit Hilfe der WCX- und RP-Monolith-Kapillaren wesentlich schneller erfolgt (B und C). Durch die deprotonierten Sulfonylgruppen des starken Ionenaustauschers kommt eine hohe negative Ladungsdichte in der SCX-Monolith-Kapillare zustande. Dadurch ist eine starke Wechselwirkung der positiv geladenen Analyten und der stationären Phase zu erwarten. Während bei dem Monolith mit starkem Kationenaustauscher D-Ala-L-PheOH eine kürzere Retentionszeit gegenüber dem Diastereomer L-Ala-L-PheOH aufweist, ist eine

geringere Retention der LL-Form bei dem Einsatz von WCX- resp. RP-Monolith zu beobachten.



**Abbildung 11.** Vergleich der Trennung der Diastereomere L/D-Ala-L-PheOH mittels CEC bei Verwendung eines (A) SCX-, (B) WCX- und (C) RP-Monolithen. (1) D-Ala-L-PheOH, (2) L-Ala-L-PheOH  
Messbedingungen: 20 cm Monolith, 20/27 cm Kapillare, 75  $\mu\text{m}$  I.D.; 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 2,0; 40 % ACN; Spannung: 12 kV; UV-Detektion bei 214 nm.

Die Trennung der Isomere von L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH mit der RP-Phase und des WCX-Monolithen unter Verwendung gleicher Parameter ist in der Abbildung 12 dargestellt. Bei dem Vergleich beider Monolithe zeigte sich eine unterschiedliche Retentionsreihenfolge der diastereomeren  $\alpha$ -Asp-Peptide. Während für die  $\beta$ -Diastereomere mit D-Konfiguration am Aspartyl-Rest für beide Monolithe längere Retentionszeiten gegenüber der L-Form beobachtet wurden, migrieren bei den  $\alpha$ -Diastereomeren die D-Asp-Peptide unter Verwendung des WCX-Monolithen schneller als die L-Formen (Manuskript 2). Das gleiche Trennverhalten wurde für die Isomere von  $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-L-PheOMe beobachtet (Manuskript 1). Die Elutionsreihenfolgen beruhen somit nicht ausschließlich auf der Wanderung im elektrischen Feld, bei Verwendung von gleichen Puffern, sondern auch auf Wechselwirkungen mit dem Polymer.



**Abbildung 12.** Trennung der Isomere von L-Phe-α/β-L/D-Asp-GlyOH mittels CEC bei Verwendung einer RP- (A) WCX-Monolith-Kapillare (B).

Messbedingungen: 20 cm Monolith, 20/27 cm Kapillare, 75 μm I.D.; 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 2,0; 40 % ACN; Spannung: 12 kV; UV-Detektion bei 214 nm

x = unbekannte synthetische Verunreinigung

Der Monolith mit schwachem Kationenaustauscher (WCX) bietet gegenüber dem mit starkem Kationenaustauscher (SCX) Vorteile. Da bei einem pH von 2,0 die Carboxylgruppen des Ionenaustauschers noch protoniert sind, ist eine geringere Interaktion zwischen dem positiv geladenem Peptid und der stationären Phase vorhanden als zu den negativ geladenen Sulfongruppen des SCX-Monolithen. Vermutlich konnte aus diesem Grund keine Elution der diastereomeren α- und β-Tripeptide L-Phe-L/D-Asp-GlyOH innerhalb von 60 min beobachtet werden (Manuskript 2). Obwohl sich der RP- und WCX-Monolith in ihrer Struktur stark unterscheiden, zeigen sie bis auf die Umkehr der Elutionsreihenfolge ein ähnliches Trennmuster. Die Verwendung des hydrophoben Acrylat- und des hydrophilen Polyacrylamid-Monolithen erlauben eine Trennung der vier Isomere von α/β-L/D-Asp-L-PheOMe, wobei die Vorteile hinsichtlich der Trenneffizienz beim RP-Monolithen auf Basis von Laurylacrylat liegen (Manuskript 1, Manuskript 2).

## 5.2 Einfluss der mobilen Phase auf die Trenneffizienz in der CEC

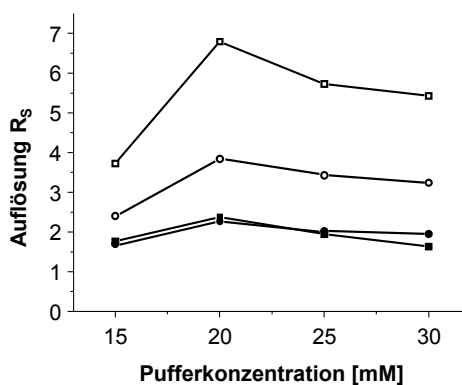
### 5.2.1 Anteil des organischen Lösungsmittels

Der Anteil an organischem Lösungsmittel ist entscheidend für die Trennung. Da die Viskosität von Acetonitril-Wasser-Mischungen aufgrund geringerer Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen wesentlich kleiner ist als von Methanol-Wasser-Mischungen<sup>[33]</sup>, wurde Acetonitril als *organic modifier* eingesetzt. Durch die Herabsetzung

der Viskosität des verwendeten Puffers ist eine schnellere Migration der Teilchen im elektrischen Feld möglich<sup>[119]</sup>. Bei der Trennung der meisten Peptide mittels CEC erhöhte sich die elektrophoretische Mobilität mit zunehmendem ACN-Anteil (Manuskript 1, Manuskript 2). Jedoch wurde bei ACN-Anteilen über 70 % Instabilitäten in der Basislinie und des Stroms resp. ein Zusammenbrechen des Stroms beobachtet.

### 5.2.2 Pufferkonzentration

Aufgrund der einfachen Handhabung und Detektion im UV-Bereich wurde zur Trennung von Phe-Asp-GlyOH und Phe-Asp-GlyNH<sub>2</sub> ein Natriumphosphatpuffer verwendet. Bei der Verwendung des hydrophoben Monolithen konnte mittels CEC-Methode keine signifikante Änderung der Retentionszeit in Abhängigkeit der Pufferkonzentration festgestellt werden (Manuskript 1). Im Gegensatz dazu wurden längere Retentionszeiten mit steigender Konzentration der mobilen Phase bei der Verwendung des hydrophilen WCX-Monolithen beobachtet (Manuskript 2). Die Trennung der Aspartyl-Peptide ist somit abhängig von der Konzentration des Natriumphosphatpuffers. Die größte Auflösung der Aspartyl-Diastereomere bei Verwendung der WCX-Monolith-Kapillaren mit einer sauren mobilen Phase wurde bei einer Konzentration von 20 mM Natriumphosphat ermittelt (Abbildung 13).



**Abbildung 13.** Abhängigkeit der Auflösung diastereomerer Peptide von der Pufferkonzentration.

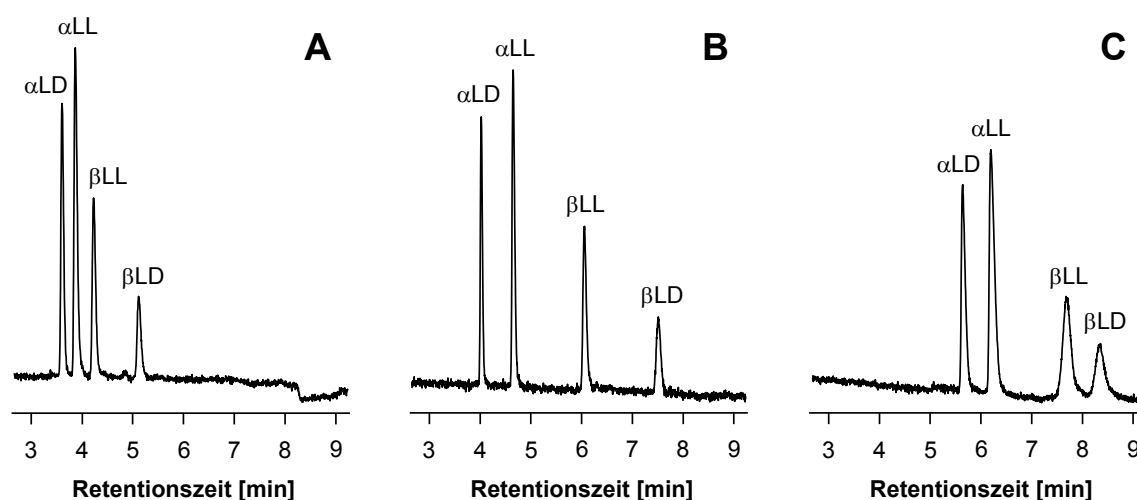
■, L-Phe-α-L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub>; □, L-Phe-β-L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub>; ●, L-Phe-α-L/D-Asp-GlyOH;  
○, L-Phe-β-L/D-Asp-GlyOH

Messbedingungen: 20 cm WCX-Monolith, 20/27 cm Kapillare, 75 μm I.D.; Natriumphosphat-Puffer, pH 2,0; 60 % ACN; Spannung: 12 kV; UV-Detektion bei 214 nm



### 5.2.3 pH-Wert

Bei der Trennung von Aspartyl-Peptiden mit RP- und WCX-Monolithen führt eine Erhöhung des pH-Wertes zu längeren Retentionszeiten (Manuskript 1, Manuskript 2). Die Abbildung 14 zeigt die Auftrennung der Isomere von L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub> bei drei unterschiedlichen pH-Werten unter Verwendung des WCX-Monolithen. Unter sonst gleichen Bedingungen lässt sich bei einer Erhöhung des pH-Wertes eine größere Auflösung der Signale feststellen. Das höchste Auflösungsvermögen dieser vier Isomere in der CEC mit dem WCX-Monolithen wurde bei einem pH-Wert von 3,0 beobachtet.



**Abbildung 14.** Trennung von L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub> mit WCX-CEC bei (A) pH 2,0 (B) pH 3,0 und (C) pH 4,0.

Messbedingungen: 20 cm WCX-Monolith, 20/27 cm Kapillare; 20 mM Natriumphosphatpuffer; 60 % ACN; Spannung: 15 kV

Für die Auflösung der Isomere von L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH wurde ein pH-Optimum von 2,5 ermittelt (Manuskript 2). Ab einem pH von 3,5 sind die Retentionszeiten sehr hoch und eine Peakverbreiterung ist zu beobachten. Die Diastereomere der  $\alpha$ -Formen liegen in einem Teil des sauren pH-Bereichs nach außen neutral geladen vor, da die pK<sub>a</sub>-Werte der freien Carboxylgruppe des Glycins in den Peptidisomeren bei etwa 3,5 liegen, die der Asparaginsäure jedoch über 4,0. Ein Teil der  $\beta$ -Diastereomere ist hingegen ab einem pH von etwa 3,5 negativ geladen, was eine Migration zur Kathode erschwert.

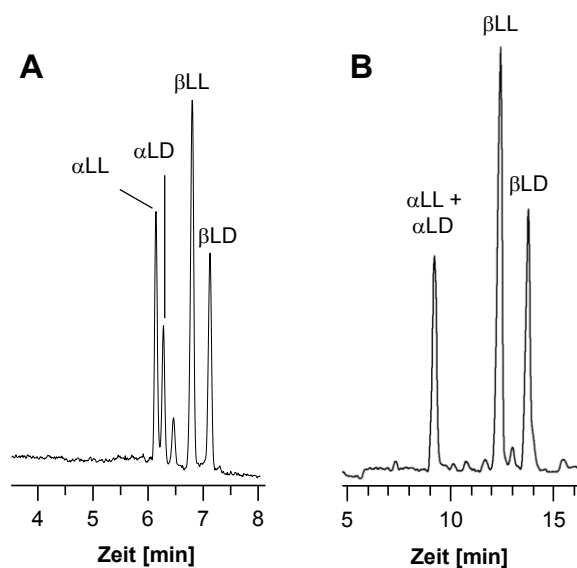
Durch die unterschiedlichen Dissoziationskonstanten von  $\alpha$ - und  $\beta$ -verknüpften Asp-Peptiden sowie L- und D-Diastereomeren besitzen die Isomere von Phe-Asp-GlyNH<sub>2</sub> und Phe-Asp-GlyOH zwischen pH 2,0 und 4,0 unterschiedliche Ladungsdichten. Dadurch wird eine unterschiedlich starke Auftrennung im elektrischen Feld innerhalb der Kapillare ermöglicht. Dabei zeigen  $\beta$ -Diastereomere in der Regel größere Auflösungen als die

entsprechenden  $\alpha$ -verknüpften Asp-Peptide. Im Gegensatz dazu wurden bei der Trennung der Isomere von  $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-L-PheOMe für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diastereomere unterschiedliche pH-Optima bezüglich der Auflösung festgestellt (Manuskript 2). Die pH-abhängige Änderung des Auflösungsvermögens der Diastereomere von L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub> und  $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-L-PheOMe deckt sich mit den Ergebnissen von Sabah unter Verwendung der CZE<sup>[120]</sup>.

### 5.3 Trenneffizienz der CEC im Vergleich zur CZE

Die CEC stellt besonders für die Trennung von diastereomeren Asp-Peptiden eine Verbesserung gegenüber der CZE dar. Die bekannt hohe Trenneffizienz der CZE wird kombiniert mit einer stationären Phase, welche zur Erhöhung der Selektivität beiträgt. Die elektrophoretische Mobilität ist Ursache für die Migration der Peptide. Die Trennung dieser Peptide wird durch die chromatographischen Interaktionen unterstützt, was in einer besseren Auflösung von Peptidisomeren resultiert. Betrachtet man die Trennung von Peptiden in der CEC gegenüber der CZE, so werden vereinzelt Vorgänge der Umkehr der Elutionsreihenfolge und Verkürzung der Analysenzeiten beobachtet (Manuskript 1, Manuskript 2).

Eine vollständige Trennung der Isomere des Tripeptids L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH wurde mittels RP-CEC gegenüber der CZE erreicht (Abbildung 15). Im Gegensatz zur CZE-Methode<sup>[22;121]</sup> konnten die vier Peptide L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH, ohne Zusatz von Cyclodextrinen, vollständig in einem Lauf voneinander getrennt werden (Manuskript 1). Auch der Einsatz eines hydrophilen Monolithen mit schwachem Ionenaustauscher war erfolgreich für die vollständige Trennung der Isomere von L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH (Manuskript 2, vgl. auch Abbildung 12). Somit erlaubt die CEC eine sehr schnelle und effiziente Trennung von isomeren sowie diastereomeren Aspartyl-Tripeptiden.

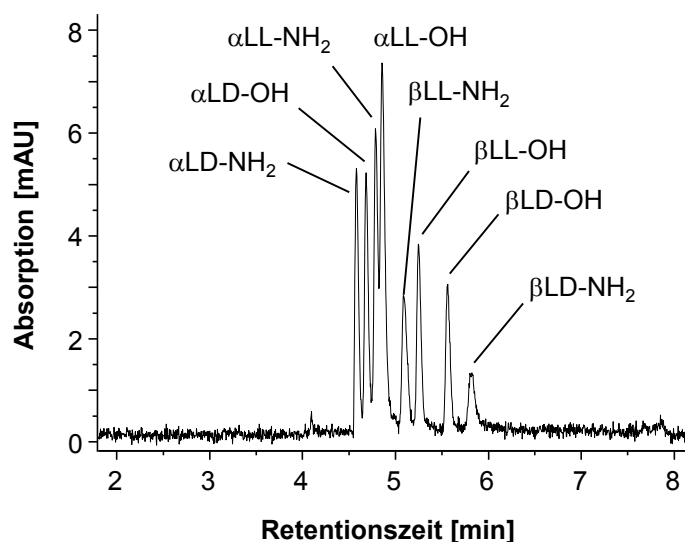


**Abbildung 15.** Trennung der Isomere von L-Phe-α/β-L/D-Asp-GlyOH mittels **A)** RP-CEC (Retentionszeit) und **B)** CZE (Migrationszeit) <sup>[121]</sup>.

Messbedingungen: **RP-CEC:** 20 cm RP-Monolith, 20/27 cm Kapillare, 75 μm I.D.; 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 2,0; 40 % ACN; Spannung: 12kV; **CZE:** unbehandelte Quarzkapillare, 40/50,2 cm, 50 μm I.D.; 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 3,0; Spannung: 25 kV;

Mit Hilfe des WCX-Monolithen konnte außerdem die gleichzeitige Trennung von L-Phe-α/β-L/D-Asp-GlyOH und der analogen Amide erreicht werden (Abbildung 16). Die Tabelle 5 zeigt die Migrations- resp. Retentionsreihenfolgen der acht Peptide bei Anwendung der drei Verfahren CEC, CZE und HPLC. Während in der CZE und HPLC Co-Elutionen beobachtet wurden, konnten in der CEC, unter Verwendung des WCX-Monolithen, alle acht Signale detektiert werden. Weiterhin ist die Reihenfolge der Migration resp. Retention bei allen drei Methoden unterschiedlich. Während bei den Methoden der CZE und CEC die α-Peptide schneller migrieren als die entsprechenden β-Formen, weisen bei der HPLC-Methode von De Boni die β-Peptide eine geringere Retention auf<sup>[122]</sup>.

Durch die erfolgreiche Trennung von kleinen isomeren Peptiden (2-3 Aminosäuren) mittels CEC wurde die Trennung von langkettigen Diastereomeren (24 Aminosäuren) untersucht. Unter Verwendung des RP-Monolithen und einem sauren Natriumphosphatpuffer konnten die Diastereomere des L/D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactid voneinander getrennt werden (Manuskript 1).



**Abbildung 16.** Trennung der acht Isomere von L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH/NH<sub>2</sub> mit CEC.

Messbedingungen: 20 cm WCX-Monolith, 20/27 cm Kapillare, 75  $\mu$ m I.D.; 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 2,0; 60 % ACN; Spannung: 12kV

**Tabelle 5.** Retentionsreihenfolge der Isomere von L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH/NH<sub>2</sub> mittels CEC, CZE und HPLC. (\* = Co-Migration resp. Co-Elution von L/D- resp.  $\alpha/\beta$ -Isomeren)

Trennverfahren \ Peptidisomer								
	L-Phe- $\alpha$ -D-Asp-GlyNH <sub>2</sub>	L-Phe- $\alpha$ -D-Asp-GlyOH	L-Phe- $\alpha$ -L-Asp-GlyNH <sub>2</sub>	L-Phe- $\alpha$ -L-Asp-GlyOH	L-Phe- $\beta$ -L-Asp-GlyNH <sub>2</sub>	L-Phe- $\beta$ -L-Asp-GlyOH	L-Phe- $\beta$ -D-Asp-GlyOH	L-Phe- $\beta$ -D-Asp-GlyNH <sub>2</sub>
<b>CEC</b> (WCX-Monolith) (20 mM Phosphatpuffer, pH 3,0; 60 % ACN)	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>CZE</b> (Quarzkapillare, unbehandelt) (50 mM Phosphatpuffer, pH 3,0)	1	3*	2	3*	5	7	8	6
<b>HPLC</b> (RP18-Säule) Gradient (2-12 % ACN; 0,1 % TFA)	5	6*	1*	8	1*	4	6*	3

## 5.4 Anwendungen der Elektromigrationsverfahren

### 5.4.1 Analytik des ACTH-Analogons Tetracosactid

Durch unvollständige Kopplungen bei der Festphasenpeptid-Synthese erhält man neben der Hauptverbindung (Tetracosactid) Fragment-Peptide, welche durch Aufreinigung, z.B. mittels präparativer HPLC, zum Großteil eliminiert werden können.

Zunächst wurde die Trennung des Tetracosactids vom Diastereomer und vom Tetracosactid-Sulfoxid mittels CZE untersucht. Dabei wurde durch Zusatz von Diethylentriamin eine bessere Peakschärfe der drei Substanzen erreicht. Diethylentriamin wird für ein sogenanntes dynamisches Coating eingesetzt, so dass Peptide eine geringere Interaktion mit der Silanoloberfläche eingehen<sup>[123]</sup>. Aufgrund dieser abnehmenden Wechselwirkung konnte die Peakschärfe geringfügig erhöht werden. Eine bessere Trennung des Sulfoxids vom Tetracosactid war ebenfalls zu beobachten, was vermutlich durch eine Erhöhung der Viskosität zu begründen ist.

Um weitere Aussagen über die Reinheit von zwei Tetracosactid-Chargen zu erhalten, wurden CZE-MS-Messungen durchgeführt. In beiden Chargen konnten insgesamt zwölf verwandte Substanzen strukturell zugeordnet werden. Neben den Verunreinigungen D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactid (Substanz-Nr. 11) und Tetracosactid-Sulfoxid (Substanz-Nr. 12) wurden ausschließlich Peptid-Fragmente detektiert (Tabelle 6). Alle Fragmente, bis auf eins, lassen sich durch unvollständige Peptidsynthese erklären. Die Verunreinigung mit der Substanz-Nr. 13 entsteht vermutlich durch Spaltung zwischen Gly<sup>14</sup> und Lys<sup>15</sup>. Bei einem Vergleich der zwei untersuchten Chargen wurde festgestellt, dass beide Proben etwa dieselbe Konzentration an SYSMEHFRWGKPVG (Substanz-Nr. 13) aufweisen. Eine der Chargen enthielt weitaus weniger Fragmente und D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactid. Ein erhöhter Anteil an KKRRPVKVYP, welcher durch die mögliche Hydrolyse bedingt ist, konnte nicht festgestellt werden.

**Tabelle 6.** Aminosäure-Sequenzen des Tetracosactids (fettgedruckt) und der mit CZE-ESI-MS ermittelten Verunreinigungen. \* = D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactid; \*\* = Tetracosactid-Sulfoxid

Substanz-Nr.	Aminosäure-Sequenz	Ermittelte Masse (M <sub>r</sub> )	Anzahl der Aminosäuren (basischen Aminosäuren)
1	RRPVKVYP	1013,6134	8 (3)
2	KKRRPVKVYP	1269,8034	10 (5)
3	VGKKRRPVKVYP	1425,8932	12 (5)
4	PVGKKRRPVKVYP	1522,9460	13 (5)
5	KPVGKKRRPVKVYP	1651,0410	14 (6)
6	GKPVGKKRRPVKVYP	1708,0624	15 (6)
7	RWGKPVGKKRRPVKVYP	2050,2429	17 (7)
8	FRWGKPVGKKRRPVKVYP	2197,3113	18 (7)
9	SMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYP	2681,4853	22 (8)
<b>10</b>	<b>SYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYP</b>	<b>2933,5743</b>	<b>24 (8)</b>
11	*SYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYP	2933,5743	24 (8)
12	**SYSM(O)EHFRWGKPVGKKRRPVKVYP	2949,5629	24 (8)
13	SYSMEHFRWGKPVG	1679,7878	14 (3)

#### 5.4.2 Sirtuin-Enzym-Assay

Es wurde ein CZE-basierter Enzym-Assay für Sirtuine entwickelt. Dazu wurden sechs Fmoc-Peptide synthetisiert, wobei drei acetyliert sind. Die Trennung der Peptide wurde mittels CZE durchgeführt und validiert. Die acetylierten Peptide wurden als potentielle Substrate an zwei Sirtuinen getestet. Weiterhin wurden Inhibitoren der Sirtuine untersucht.

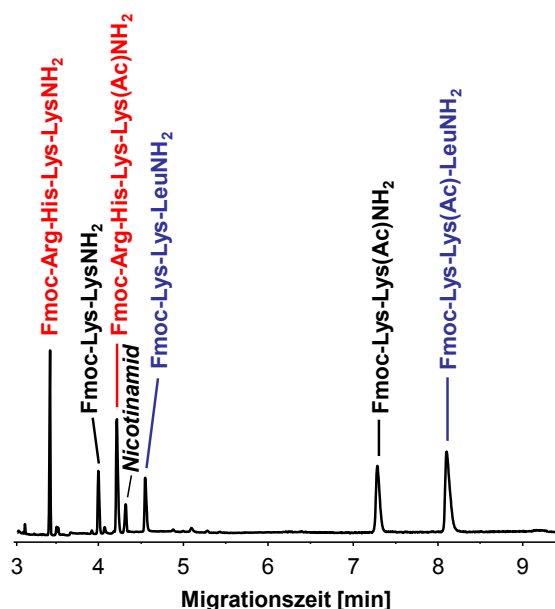
##### **Peptidsubstrate**

Die Synthese der sechs Fmoc-Peptide (Fmoc-Lys-Lys/Lys(Ac)NH<sub>2</sub>, Fmoc-Arg-His-Lys-Lys/Lys(Ac)NH<sub>2</sub> und Fmoc-Lys-Lys/Lys(Ac)-LeuNH<sub>2</sub>) erfolgte stets unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe (Fluorenylmethoxycarbonyl) mittels Festphasensynthese<sup>[124]</sup>. Dabei wurde 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) als Kupplungsreagenz und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) als Additiv verwendet. Jedes Peptid wurde anschließend mittels präparativer RP-HPLC unter Verwendung eines Acetonitril-Wasser-Gradienten mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) aufgereinigt. Die Identifizierung der Peptide erfolgte durch MALDI TOF.

Der Ursprung für die Synthese dieser Modellpeptide liegt in der Funktionalität des p53-Proteins. Die Strukturen der Fmoc-Substrate basieren auf der Aminosäuresequenz dieses Proteins in den Positionen 379 bis 383. Am N-Terminus der Peptide wurde die Fmoc-Schutzgruppe als Chromophor zur Erhöhung der Detektionsempfindlichkeit beibehalten.

### Methodenentwicklung und –validierung

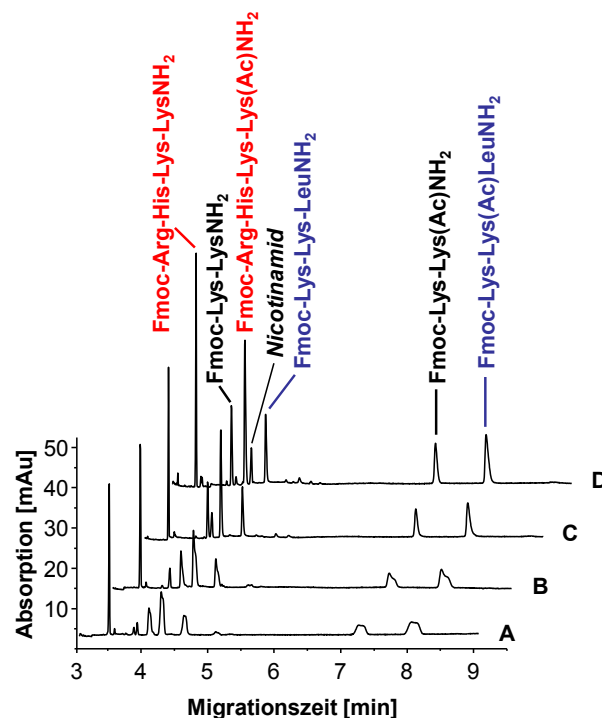
Das Lys-Lys-Motiv wurde für alle drei Modellpeptid-Paare beibehalten, um mindestens eine positive Ladung bei der Vermessung mittels CZE zu gewährleisten. Der  $pK_a$ -Wert der  $\epsilon$ -Aminofunktion des Lysins beträgt bei Polypeptiden etwa 10,5<sup>[125]</sup>, so dass bei einem pH-Wert unterhalb von 9,0 eine permanente Ladung der Modellpeptide vorliegt. Um die Umsetzung der synthetisierten Fmoc-Peptide durch Sirtuine zu untersuchen, war es primär wichtig, die Trennung des jeweils acetylierten vom entsprechenden deacetylierten Peptid zu optimieren. Bei einem pH-Wert von 2,7 erfolgte die beste Trennung. Nicotinamid, welches als Nebenprodukt der Enzymreaktion entsteht (vgl. Kapitel 1.4.3), konnte ebenfalls detektiert werden (Abbildung 17). Die Verbindungen  $NAD^+$  und 2'-O-acetyl-ADP-Ribose als weitere Substanzen sind unter diesen Bedingungen aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladen und wandern nicht zur Kathode. Eine Detektion blieb somit aus.



**Abbildung 17.** CZE-Trennung der sechs Fmoc-Peptide und des Nicotinamids.

Messbedingungen: unbehandelte Quarzkapillare, 30/37 cm, 50  $\mu$ m I.D., 200 mM Tris-Phosphatpuffer, pH 2,7; Spannung: 20 kV

Die Enzymreaktionen wurden zu verschiedenen Zeiten durch den Zusatz von eiskalter Trichloressigsäure (TCA) beendet. Nach Zentrifugation der denaturierten Proteine (BSA und Enzym) wurden die Proben vermessen. Durch den Zusatz der TCA bedingt, enthalten die Inkubationsproben einen sehr hohen Salz-Gehalt, der zu einer Peakverbreiterung führt. Verschiedene Stacking-Methoden sind in der Literatur beschrieben, um dieses Problem zu unterbinden<sup>[126;127]</sup>. Eine effiziente Methode ist das pH-vermittelte Stacking, welches für kationische und anionische Analyten geeignet ist<sup>[128-130]</sup>. Die Entwicklung eines NaOH-vermittelten Stackings erfolgte durch Injektion einer definierten Menge an Natronlauge vor der Probe und führte zu einer erhöhten Peakschärfe (Abbildung 18). Beim Stromfluss wandern die Hydroxid-Ionen aufgrund der negativen Ladung in Richtung Anode und damit durch die Probenzone. Durch die Reaktion der dort enthaltenen Hydronium-Ionen mit den Hydroxid-Ionen der Natronlauge entsteht Wasser, was in einer Erniedrigung der Leitfähigkeit der Probenzone resultiert<sup>[131]</sup>. Da die Analyten über einen großen pH-Bereich positiv geladen sind, wandern sie weiterhin gerichtet zur Kathode (Manuskript 3). Die Methode des Stackings ist begrenzt, da aufgrund der vermehrten Wärmeproduktion die Bildung von Gasbläschen begünstigt ist, was zum Stromzusammenbruch führt<sup>[129]</sup>.

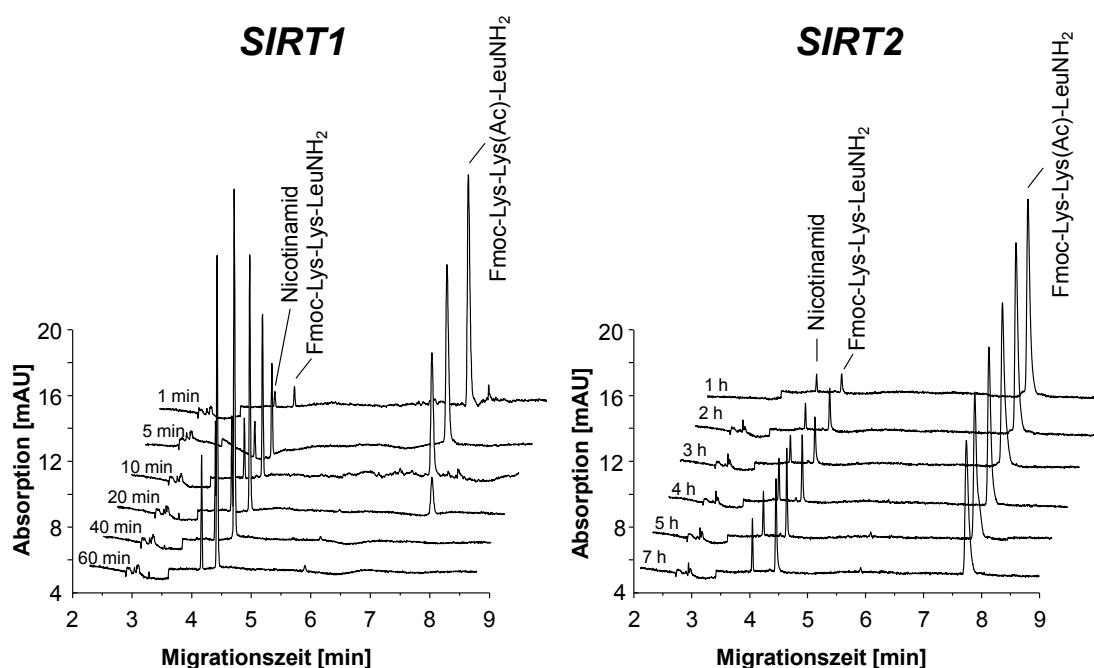


**Abbildung 18.** Elektropherogramme zum „pH-vermittelten Stacking“. **A)** direkte Injektion der Probe für 10 sec; **B)** hydrodynamische Injektion von 0,1 M NaOH für 20 sec, anschließend Probeninjektion für 10 sec; **C)** hydrodynamische Injektion von 0,2 M NaOH für 20 sec, anschließend Probeninjektion für 10 sec; **D)** hydrodynamische Injektion von 0,3 M NaOH für 20 sec, anschließend Probeninjektion für 15 sec. (optimierte Bedingungen, siehe Abbildung 17)



### SIRT-Assay

Die acetylierten Peptide Fmoc-Lys-Lys(Ac)NH<sub>2</sub>, Fmoc-Arg-His-Lys-Lys(Ac)NH<sub>2</sub> und Fmoc-Lys-Lys(Ac)-LeuNH<sub>2</sub> sind Substrate der Enzyme *SIRT1* und *SIRT2*. Beide Enzyme deacetylieren diese Verbindungen, wobei eine schnellere Transformation durch *SIRT1* erfolgt. Die Peakflächen der korrespondierenden Peptide und Nicotinamid nahmen entsprechend zu. Abbildung 19 zeigt die Umsetzung des acetylierten Tripeptids mit beiden Enzymen. Nach einstündiger Inkubation mit einer Enzymaktivität von 2,5 U pro 100 µl *SIRT1* wurden mehr als 87 % aller drei acetylierten Peptide umgesetzt (Manuskript 3, Manuskript 4). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit einem Enzymassay für *SIRT1*, bei dem 90 % eines acetylierten Peptids, welches Aminomethylcumarin (AMC) als Fluorophor enthält, unter ähnlichen Bedingungen umgesetzt wurde<sup>[132]</sup>. Im Gegensatz dazu wurde nach dreistündiger Inkubation mit *SIRT2* nur zwischen 14 und 26 % der acetylierten Peptide umgesetzt (Manuskript 4). Diese schwächer ausgeprägte Deacetylierung kann durch die Funktion als ADP-Ribosyl-Transferase<sup>[95]</sup>, unterschiedlichen Wirkungsgrad der beiden Enzyme<sup>[133;134]</sup> oder Substrataffinität zu den Enzymen<sup>[135]</sup> erklärt werden.



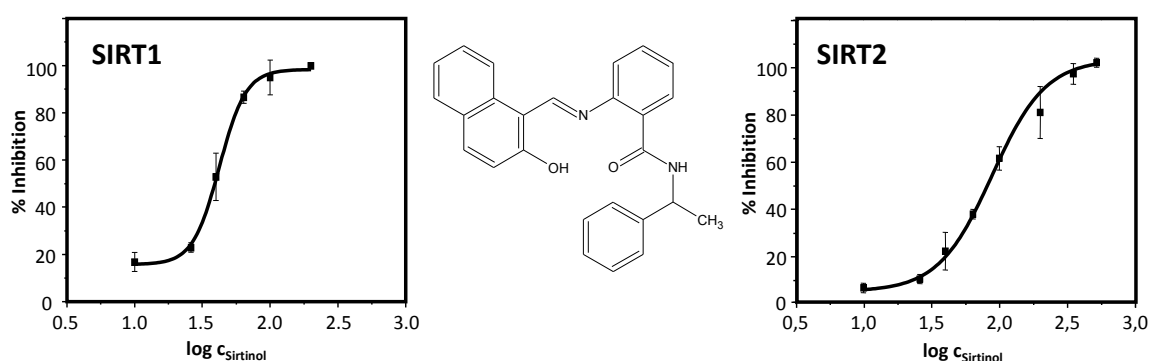
**Abbildung 19.** Umsetzung von Fmoc-Lys-Lys(Ac)-LeuNH<sub>2</sub> mit *SIRT1* (links) und *SIRT2* (rechts), Zeitangabe an den Elektropherogrammen = Inkubationszeit am jeweiligen Enzym

Um die Fmoc-Substrate weiter zu charakterisieren, wurde die Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt. Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) wurde für die drei Substrate zwischen 16,7 und 34,6 µM für *SIRT1* sowie zwischen 34,7 und 58,6 µM für *SIRT2* ermittelt.

Bereits beschriebene Substrate für *SIRT*-Enzyme zeigten ähnliche  $K_m$ -Werte. Für ein Fluorescein enthaltendes Peptid mit 23 AS wurde ein  $K_m$ -Wert von 11,9  $\mu\text{M}$  erhalten<sup>[136]</sup>. Weiterhin untersuchte man ein Fmoc-gelabeltes Peptid mit 16 AS und ermittelte  $K_m$ -Werte zwischen 57 und 87  $\mu\text{M}$  für *SIRT1*<sup>[137]</sup>. Ein kommerziell erhältliches Peptid (Fluor de Lys), welches vier Aminosäuren und AMC am C-Terminus trägt, zeigte eine Affinität mit einem  $K_m$ -Wert von 108  $\mu\text{M}$  zum *SIRT1*, was um einen Faktor von 2-3 geringer ist<sup>[138]</sup>. Somit konnte gezeigt werden, dass kurzkettige Peptide mit einer Fmoc-Gruppe am N-Terminus hohe Affinitäten zu den Sirtuinen aufweisen.

Die Fmoc-Peptidsubstrate dienen weiterhin der Ermittlung von Inhibitoren der Sirtuine. Der bekannteste Inhibitor für Sirtuine ist das Sirtinol<sup>[139]</sup>, dessen Struktur in Abbildung 20 dargestellt ist. In einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  inhibiert es bis zu 90 % der *SIRT1*-katalysierten Deacetylierungen, während die Inhibition des *SIRT2* nur bei etwa 66 % liegt (Manuskript 4). Durch Testungen verschiedener Konzentrationen des Sirtinols konnten die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der beiden Enzyme ermittelt werden. Die Kurven in Abbildung 20 zeigen den typischen sigmoidalen Verlauf. Aus den  $\text{IC}_{50}$ -Werten konnten durch bekannte Substratkonzentrationen  $[\text{S}]$  und  $K_m$ -Werte der acetylierten Fmoc-Peptide die Inhibitorkonstante ( $K_i$ ) für jedes Peptid nach der Gleichung 9 berechnet werden und sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

$$\text{IC}_{50} = \left( 1 + \frac{[\text{S}]}{K_m} \right) \cdot K_i \quad (9)$$

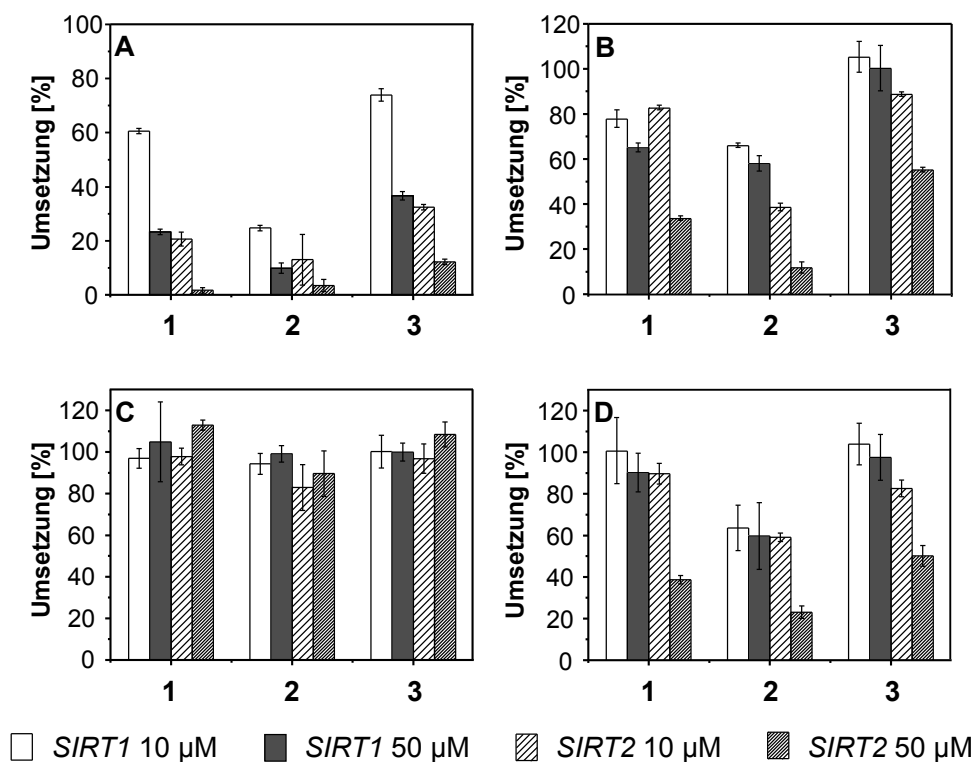


**Abbildung 20.** Struktur des Sirtinols (Mitte) und Inhibition des *SIRT1* (links) sowie *SIRT2* (rechts) in Abhängigkeit der molaren Sirtinolkonzentration ( $c_{\text{Sirtinol}}$ ) am Beispiel des Fmoc-Lys-Lys(Ac)-LeuNH<sub>2</sub>.

**Tabelle 7.**  $IC_{50}$ - und  $K_i$ -Werte des Sirtinols bei Verwendung der acetylierten Fmoc-Peptide als Substrate für *SIRT1* und *SIRT2*. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n=3$ )

		Fmoc-Lys-Lys(Ac)NH <sub>2</sub>	Fmoc-Lys-Lys(Ac)-LeuNH <sub>2</sub>	Fmoc-Arg-His-Lys-Lys(Ac)NH <sub>2</sub>
<b><i>SIRT1</i></b>	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	36,3 $\pm$ 1,2	42,5 $\pm$ 6,6	35,0 $\pm$ 4,8
	$K_i$ [ $\mu$ M]	5,2 $\pm$ 0,2	7,0 $\pm$ 1,1	9,0 $\pm$ 1,2
<b><i>SIRT2</i></b>	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	118,6 $\pm$ 6,6	95,8 $\pm$ 8,4	90,0 $\pm$ 3,3
	$K_i$ [ $\mu$ M]	30,6 $\pm$ 1,7	28,1 $\pm$ 2,5	33,3 $\pm$ 1,2

Die  $IC_{50}$ -Werte für *SIRT1* sind etwa 1,5- bis 3-mal kleiner als die Werte der beschriebenen Substrate Z-MAL<sup>[132;140]</sup> und Histon-Proteine<sup>[141]</sup>. Die Inhibition des *SIRT2*-Enzyms ist dagegen mit der Literatur vergleichbar. Sirtinol zeigt eine höhere Inhibition an *SIRT2* gegenüber *SIRT1*<sup>[132;140;142]</sup>, während bei Verwendung der Fmoc-Peptidsubstrate die Inhibition von *SIRT1* und *SIRT2* im etablierten Enzymassay umgekehrt ist. Dieser Unterschied lässt sich durch die verschiedenen experimentellen Vorgänge erklären. Daher sollte ein Vergleich immer unter Betrachtung des Enzym-Assays und der Enzym-Substrate erfolgen. Vier weitere bereits beschriebene Sirtuin-Inhibitoren wurden untersucht (Manuskript 4). Dabei wurden zwei Bis-indolylmaleimide (Ro 31-8220 und GF 109203X)<sup>[142]</sup> und zwei Splitomicin-Derivate (8-Brom- $\alpha/\beta$ -phenylsplitomicin)<sup>[143]</sup> in den Konzentrationen 10 und 50  $\mu$ M eingesetzt. Die restliche Enzymaktivität von *SIRT1* und *SIRT2* ist als prozentuale Umsetzung der Peptidsubstrate unter den jeweiligen Bedingungen in der Abbildung 21 zusammengefasst. Das Ausmaß der Inhibition variiert mit der Struktur der Fmoc-Peptidsubstrate. Da Ro 31-8220 der effektivste Inhibitor der vier getesteten Verbindungen war, wurde dieser in den Konzentrationen 0,5 und 2  $\mu$ M eingesetzt, wobei das Substrat Fmoc-Arg-His-Lys-Lys(Ac)NH<sub>2</sub> zum Einsatz kam. *SIRT1* setzte in diesen Inhibitorkonzentrationen noch 88,8 resp. 67,1 % des Peptids um. *SIRT2* erreichte nur eine Umsetzung von 57,9 resp. 17,9 %. Ro 31-8220 ist für *SIRT2* verglichen mit *SIRT1* ein effektiverer Inhibitor, was auch für das Substrat Z-MAL berichtet wurde<sup>[142]</sup>. Aus diesen Werten lässt sich die  $IC_{50}$  für Ro 31-8220 an *SIRT2* abschätzen, welche im unteren mikromolaren Bereich liegt. Bei den Phenylsplitomicinen konnte keine Inhibition von *SIRT1* und *SIRT2* festgestellt werden, obwohl sie in einem anderen Assay als Sirtuin-Inhibitoren beschrieben sind<sup>[143]</sup>. Dieser Sachverhalt lässt sich durch unzureichende Löslichkeiten beider Verbindungen im Puffer des Sirtuin-Assays erklären.



**Abbildung 21.** Inhibition von SIRT1 und SIRT2 durch Ro 31-8220 (A), GF 109203X (B), 8-Brom- $\alpha$ -phenylsplitomicin (C) und 8-Brom- $\beta$ -phenylsplitomicin (D) ausgedrückt als prozentualer Anteil der Umsetzung der Peptidsubstrate in An- und Abwesenheit des Inhibitors.

1 = Fmoc-Lys-Lys(Ac)NH<sub>2</sub>, 2 = Fmoc-Arg-His-Lys-Lys(Ac)NH<sub>2</sub>, 3 = Fmoc-Lys-Lys(Ac)-LeuNH<sub>2</sub>; die Balken entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung (n = 3)

## 6 Zusammenfassung

Diese Arbeit gliedert sich in drei Hauptteile, wobei im ersten Teil die CEC-Trennung von diastereomeren Peptiden unter Verwendung von Monolith-Kapillaren untersucht wurde. Die Bestimmung verwandter Substanzen des ACTH-Analogons Tetracosactid mittels CZE-MS sowie die Entwicklung eines CZE basierten Assays von Sirtuin-Enzymen wurden im zweiten und dritten Teil durchgeführt.

### ***Trennung von Peptiden mittels CEC unter Verwendung von Monolith-Kapillaren***

Verschiedene Monolith-Kapillaren auf der Basis von Laurylmethacrylat resp. Acrylamid und Acrylamidobuttersäure wurden durch in situ Polymerisation in Gegenwart eines Porogens synthetisiert. Es wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Monolithe erzeugt und im Hinblick auf die Trennung von isomeren Aspartyl-Peptiden mittels CEC untersucht. Die höchste Bodenzahl wurde für einen WCX-Monolithen ermittelt, welcher einen Anteil von 75 % eines binären Porogens aus Decanol und DMSO enthielt. Die Auswirkung der Zusammensetzung der mobilen Phase wurde anhand der Trennung von L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH, L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub> sowie  $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-L-PheOMe untersucht. Während der Zusatz von Acetonitril zu kürzeren Retentionszeiten führte, resultierte ein erhöhter pH-Wert des Puffers in längeren Retentionszeiten. Ein Acetonitril-Anteil oberhalb von 70 % führte allerdings zu Strominstabilitäten resp. Zusammenbrechen des Stromes. Die Entwicklung und die Untersuchungen zur Trennung von isomeren Peptiden wurden für den RP-Monolithen in ähnlicher Weise durchgeführt. Beide Monolithformen zeigen bessere Trennungen von Aspartyl-Peptiden im Vergleich zur HPLC oder CZE. Weitere diastereomere Peptide, darunter Tetracosactid und sein Diastereomer D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactid, konnten mittels CEC unter Verwendung des RP-Monolithen gut getrennt werden.

### ***Analytik des Tetracosactids durch CZE***

Das ACTH-Analogon Tetracosactid wurde durch CZE-UV und CZE-MS analysiert, um eine Information über potentielle Verunreinigungen zu erhalten. Im Bereich der CZE-UV führte der Zusatz von Diethylentriamin zu einer verbesserten Trennung des D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactids und des Tetracosactid-Sulfoxids von der Hauptsubstanz. Neben diesen Verunreinigungen wurden zehn Peptid-Fragmente, welche 8 bis 22 Aminosäuren enthalten, durch CZE-ESI-MS in den untersuchten Tetracosactid-Chargen ermittelt. Neun dieser Fragmente lassen sich durch unvollständige Kopplung während der Peptidsynthese erklären. Weiterhin wurde ein Fragment mit 14 Aminosäuren identifiziert, welches wahrscheinlich das Produkt einer hydrolytischen Spaltung zwischen Gly<sup>14</sup> und Lys<sup>15</sup> ist. In zwei untersuchten Chargen fand sich etwa die gleiche Menge dieser

Verunreinigung, während der Anteil an D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactid und anderen Peptid-Fragmenten in einer der beiden Chargen geringer ausfiel.

#### ***CZE-basierender Sirtuin-Enzym-Assay***

Ausgehend von der Aminosäuresequenz des p53-Proteins in den Positionen 379 bis 383, welches ein endogenes Substrat für Sirtuine ist, wurden Fmoc-Lys-Lys(Ac)NH<sub>2</sub>, Fmoc-Arg-His-Lys-Lys(Ac)NH<sub>2</sub> und Fmoc-Lys-Lys(Ac)-LeuNH<sub>2</sub> und deren nicht acetylierte Analoga mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Es gelang die Trennung aller sechs Peptide und Nicotinamid, welches als Nebenprodukt der Enzymreaktion entsteht, in einem sauren Natriumphosphatpuffer mittels CZE. Ein pH-vermitteltes Stacking wurde zur Erhöhung der Detektionsempfindlichkeit angewendet, da aufgrund der hohen Ionenstärke der Inkubationsprobe eine Abnahme der Sensitivität ermittelt wurde. Für die Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante von rekombinant gewonnenen humanen Sirtuinen *SIRT1* und *SIRT2* wurde die CZE-Trennung validiert. Dieser Assay folgt der Michaelis-Menten-Kinetik und die  $K_M$ -Werte liegen im Bereich der bisher beschriebenen Peptidsubstrate für Sirtuine. Verschiedene Emzyminhibitoren wurden erfolgreich an beiden Sirtuinen getestet. Damit ist dieser Enzym-Assay für die Bestimmung der Sirtuin-Aktivität und das Screening von Inhibitoren für Sirtuine geeignet.

#### ***Analytik des Tetracosactids durch CZE***

Das ACTH-Analogon Tetracosactid wurde durch CZE-UV und CZE-MS analysiert, um eine Information über potentielle Verunreinigungen zu erhalten. Im Bereich der CZE-UV führte der Zusatz von Diethylentriamin zu einer verbesserten Trennung des D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactids und des Tetracosactid-Sulfoxids von der Hauptschubstanz. Neben diesen Verunreinigungen wurden zehn Peptid-Fragmente, welche 8 bis 22 Aminosäuren enthalten, durch CZE-ESI-MS in den untersuchten Tetracosactid-Chargen ermittelt. Neun dieser Fragmente lassen sich durch unvollständige Kopplung während der Peptidsynthese erklären. Weiterhin wurde ein Fragment mit 14 Aminosäuren identifiziert, welches wahrscheinlich das Produkt einer hydrolytischen Spaltung zwischen Gly<sup>14</sup> und Lys<sup>15</sup> ist. In zwei untersuchten Chargen fand sich etwa die gleiche Menge dieser Verunreinigung, während der Anteil an D-Lys<sup>16</sup>-Tetracosactid und anderen Peptid-Fragmenten in einer der beiden Chargen geringer ausfiel.

#### ***CZE-basierender Sirtuin-Enzym-Assay***

Ausgehend von der Aminosäuresequenz des p53-Proteins in den Positionen 379 bis 383, welches ein endogenes Substrat für Sirtuine ist, wurden Fmoc-Lys-Lys(Ac)NH<sub>2</sub>, Fmoc-Arg-His-Lys-Lys(Ac)NH<sub>2</sub> und Fmoc-Lys-Lys(Ac)-LeuNH<sub>2</sub> und deren nicht acetylierte

Analoga mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Es gelang die Trennung aller sechs Peptide und Nicotinamid, welches als Nebenprodukt der Enzymreaktion entsteht, in einem sauren Natriumphosphatpuffer mittels CZE. Ein pH-vermitteltes Stacking wurde zur Erhöhung der Detektionsempfindlichkeit angewendet, da aufgrund der hohen Ionenstärke der Inkubationsprobe eine Abnahme der Sensitivität ermittelt wurde. Für die Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante von rekombinant gewonnenen humanen Sirtuinen *SIRT1* und *SIRT2* wurde die CZE-Trennung validiert. Dieser Assay folgt der Michaelis-Menten-Kinetik und die  $K_M$ -Werte liegen im Bereich der bisher beschriebenen Peptidsubstrate für Sirtuine. Verschiedene Enzyminhibitoren wurden erfolgreich an beiden Sirtuinen getestet. Damit ist dieser Enzym-Assay für die Bestimmung der Sirtuin-Aktivität und das Screening von Inhibitoren für Sirtuine geeignet.

## 7 Summary

The thesis is divided into three major parts on the CEC separation of diastereomeric peptides using monolithic capillaries, the determination of related substances in the ACTH analogue tetracosactide by CZE-MS, and the development of a CZE-based assay of sirtuin enzymes employing peptide substrates.

### ***CEC-Separation of peptides using monolithic capillaries***

Acrylamide- and methacrylate-based monolithic capillaries were synthesized by in situ polymerization of the monomers in the presence of porogenic solvents. The resulting monoliths were studied by scanning electron microscopy and characterized with regard to the separation of an mixture of isomeric and diastereomeric Asp peptides. In the case of a WCX monolith based on 4-acrylamidobutyric acid the highest number of theoretical plates were observed for a monolith prepared in the presence of 75 % of a porogenic system consisting of decanol and DMSO. The effect of the composition of the mobile phase on the separation of L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyOH, L-Phe- $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-GlyNH<sub>2</sub> and  $\alpha/\beta$ -L/D-Asp-L-PheOMe was investigated. Addition of acetonitrile led to shorter retention times while increasing the pH of the aqueous buffer component resulted in increased retention times. At acetonitrile concentrations above 70 % the system became unstable and current breakdown was observed. In a similar way, a neutral RP-monolith was synthesized and evaluated. Both types of monoliths proved to be superior for the separation of Asp peptides compared HPLC or CZE. Other diastereomeric peptides could be separated as well, including the separation of tetracosactide and its diastereomer D-Lys<sup>16</sup>-tetracosactide on the RP-monolith.

### ***Analysis of tetracosactide by CZE***

The 24mer peptide tetracosactide was analyzed by CZE-UV and CZE-MS in order to obtain information on the impurities. Using CZE-UV the addition of diethylenetriamine led in a better separation of the diastereomer D-Lys<sup>16</sup>-tetracosactide and the oxidation product Met(O)-tetracosactide from the main compound. An ammonium formate buffer, pH 2.0 was employed as background electrolyte. In addition to the known impurities Met(O)-tetracosactide and D-Lys<sup>16</sup>-tetracosactide 10 fragments comprising 8 - 22 amino acids were identified. 9 could be explained by incomplete amino acid coupling during solid phase peptide synthesis. Furthermore, a fragment containing 14 amino acids was identified that may result from cleavage between Gly<sup>14</sup> and Lys<sup>15</sup>. Two batches of tetracosactide were investigated that differed in the absolute amount of related substances.



**CZE-based sirtuin assay**

Three Fmoc-labeled peptides, Fmoc-Lys-Lys(Ac)NH<sub>2</sub>, Fmoc-Lys-Lys(Ac)-LeuNH<sub>2</sub> and Fmoc-Arg-His-Lys-Lys(Ac)NH<sub>2</sub>, were prepared by solid phase peptide synthesis as substrates for sirtuin enzymes. The sequence is derived from the p53 protein. Furthermore, the respective deacetylated peptides were also synthesized. The separation of the acetylated and deacetylated peptides was achieved in an acidic sodium phosphate buffer. Nicotinamide as a side-product of the enzymatic peptide deacetylation could be detected as well. A pH-mediated stacking procedure was developed in order to achieve the required detection sensitivity as well as to avoid peak broadening and peak splitting due to the high ionic strength of the enzyme incubation buffer. Subsequently, the CZE method was validated and applied to the determination of the Michaelis-Menten constants of the recombinant human sirtuins *SIRT1* and *SIRT2*. Values comparable to published data using other peptide substrates were obtained. Furthermore, the assay was applied to the determination of IC<sub>50</sub> values of inhibitors such as sirtinol or the bisindolylmaleimide Ro 31-8820. Thus, the new assay proved to be suitable for the determination of sirtuin activity as well as for screening enzyme inhibitors.

## 8 Abkürzungen

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

AAC	Einbuchstabencode für Aminosäuren ( <i>amino acid code</i> )
Ac	Acetyl-Rest
ACN	Acetonitril
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon, Adrenocorticotropin
ADP	Adenosindiphosphat
AIBN	Azobisisobutyronitril
Ala	Alanin
AMC	Aminomethylcumarin
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
BGE	Pufferlösung in der CZE ( <i>background electrolyte</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CE	Kapillarelektrophorese ( <i>capillary electrophoresis</i> )
CZE	Kapillarzonenelektrophorese ( <i>capillary zone electrophoresis</i> )
CEC	Kapillarelektrochromatographie ( <i>capillary electrochromatography</i> )
CGE	Kapillargelelektrophorese ( <i>capillary gel electrophoresis</i> )
CIEF	isoelektrische Fokussierung ( <i>capillary isoelectric focussing</i> )
CITP	Kapillarisotachophorese ( <i>capillary isotachophoresis</i> )
CoA	Coenzym A
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
EOF	Elektroosmotischer Fluss ( <i>electro osmotic flow</i> )
ESI	Elektrospray-Ionisation ( <i>electro spray ionisation</i> )
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Gly	Glycin
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
His	Histidin
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
IC <sub>50</sub>	Konzentration eines Inhibitors bei halbmaximaler Inhibition
I.D.	Innendurchmesser
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Kopplung zur Tandem-Massenspektroskopie
Leu	Leucin
LOD	Nachweisgrenze ( <i>limit of detection</i> )
LOQ	Bestimmungsgrenze ( <i>limit of quantitation</i> )
Lys	Lysin

---

MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MAR	siehe Sir ( <i>mating-type Regulator</i> )
MEEKC	mikroemulsionselektrokinetische Chromatographie ( <i>microemulsion electrokinetic chromatography</i> )
MEKC	mizellarelektrokinetische Chromatographie ( <i>micellar electrokinetic chromatography</i> )
MeOH	Methanol
MIP	Quecksilberporosimetrie ( <i>mercury intrusion porosimetry</i> )
MS	Massenspektrometrie
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
OT	offene Glaskapillare ( <i>open tubular</i> )
PAMBA	para-Aminomethylbenzoesäure ( <i>p-(aminomethyl)benzoic acid</i> )
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch ( <i>Pharmacopoea Europaea</i> )
Phe	Phenylalanin
pl	isoelektrischer Punkt ( <i>isoelectric point</i> )
pK <sub>a</sub>	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RP	Umkehrphase ( <i>reversed phase</i> )
RT	Raumtemperatur (i.d.R. 25 °C)
RSD	relative Standardabweichung ( <i>relative standard deviation</i> )
SAX	starker Anionenaustauscher ( <i>strong anion-exchange</i> )
SCX	starker Kationenaustauscher ( <i>strong cation-exchange</i> )
Sir	<i>Silent information regulator</i>
SIRT	humane Sirtuine
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure ( <i>trifluoroacetic acid</i> )
TOF	Time Of Flight
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultraviolett
WADA	Welt-Anti-Doping Agentur
WAX	schwacher Anionenaustauscher ( <i>weak anion-exchange</i> )
WCX	schwacher Kationenaustauscher ( <i>weak cation-exchange</i> )

## 8.2 Symbolverzeichnis

$\epsilon_0$	Dielektrizitätskonstante des Vakuums
$\epsilon_r$	Dielektrizitätskonstante des Mediums
$\eta$	Viskosität
$\zeta_p$	Zeta-Potential an der Partikeloberfläche
$\zeta_w$	Zeta-Potential an der Kapillarwand
$\mu_{\text{eff}}$	effektive (resultierende) Mobilität

---

$\mu_{eo}$	elektroosmotische Mobilität
$\mu_{ep}$	elektrophoretische Mobilität
$\sigma_{\text{offen}}$	Leitfähigkeit einer offenen Kapillare
$\sigma_{\text{gepackt}}$	Leitfähigkeit einer gepackten Kapillare
$d_c$	Kapillardurchmesser
$E$	Feldstärke
$K_i$	Inhibitor-Konstante
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
$K$	Wärmeleitfähigkeit
$Q$	Wärmeentwicklungsrate
$q$	Ladung
$r$	Radius
$R_s$	Auflösung
$[S]$	Substratkonzentration
$\Delta T$	Temperaturunterschied
$v_{\text{eff}}$	effektive (resultierende) Geschwindigkeit
$v_{eo}$	elektroosmotische Geschwindigkeit
$v_{ep}$	elektrophoretische Geschwindigkeit

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] G.K.E. Scriba; Recent advances in peptide and peptidomimetic stereoisomer separations by capillary electromigration techniques, *Electrophoresis*, **2006**, 27, 222-230.
- [2] A. Loffet; Peptides as drugs: Is there a market?, *Journal of Peptide Science*, **2002**, 8, 1-7.
- [3] *Rote Liste 2010 - Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte)*, **2010**, Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland, 2336 Seiten.
- [4] K.S. Howard et al.; Structure of Beta-Corticotropin - Final Sequence Studies, *Journal of the American Chemical Society*, **1955**, 77, 3419-3420.
- [5] R.G. Shepherd et al.; Studies with Corticotropin .1. Isolation, Purification and Properties of Beta-Corticotropin, *Journal of the American Chemical Society*, **1956**, 78, 5051-5059.
- [6] T.H. Lee, A.B. Lerner, V. Buettnerjanusch; Structure of Human Corticotropin (Adrenocorticotrophic Hormone), *Journal of Biological Chemistry*, **1961**, 236, 2970-&.
- [7] H. Kappeler und R. Schwyzer; Die Synthese eines Tetracosapeptides mit der Aminosäuresequenz eines hochaktiven Abbauproduktes des Beta-Corticotropins (ACTH) aus Schweinehypophysen, *Helvetica Chimica Acta*, **1961**, 44, 1136.
- [8] J.L. Costa et al.; Mutational analysis of evolutionarily conserved ACTH residues, *General and Comparative Endocrinology*, **2004**, 136, 12-16.
- [9] M. Thevis et al.; Determination of Synacthen in human plasma using immunoaffinity purification and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2006**, 20, 3551-3556.
- [10] M.C. Manning, K. Patel, R.T. Borchardt; Stability of Protein Pharmaceuticals, *Pharmaceutical Research*, **1989**, 6, 903-918.
- [11] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; <http://www.edqm.eu/en/Databases-10.html>, **2010**.
- [12] J. Martens und R. Bhushan; T.L.C. enantiomeric separation of amino acids, *International Journal of Peptide and Protein Research*, **1989**, 34, 433-444.
- [13] K. Tsuji, J.H. Robertso, J.A. Bach; Quantitative High-Pressure Liquid-Chromatographic Analysis of Bacitracin, A Polypeptide Antibiotic, *Journal of Chromatography*, **1974**, 99, 597-608.
- [14] I. Tomida et al.; Diastereomer ratio in peptide synthesis, possibility of application of gas chromatographic method to the estimation of diastereomer ratio in peptide coupling reaction, *Peptide Chemistry*, **1982**, 19, 19-24.
- [15] K.K. Unger et al.; Liquid Chromatography-Its Development and Key Role in Life Science Applications, *Angewandte Chemie-International Edition*, **2010**, 49, 2300-2312.
- [16] F.M. Everaerts et al.; Displacement Electrophoresis - Experiments with Counterflow of Electrolyte, *Journal of Chromatography*, **1970**, 49, 262-268.
- [17] A.J.P. Martin und F.M. Everaert; Displacement Electrophoresis, *Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical and Physical Sciences*, **1970**, 316, 493-514.

- 
- [18] S. Sabah und G.K.E. Scriba; Electrophoretic stereoisomer separation of aspartyl dipeptides and tripeptides in untreated fused-silica and polyacrylamide-coated capillaries using charged cyclodextrins, *Journal of Chromatography A*, **1998**, 822, 137-145.
- [19] S. Sabah und G.K.E. Scriba; Resolution of aspartyl dipeptide and tripeptide stereoisomers by capillary electrophoresis, *Journal of Microcolumn Separations*, **1998**, 10, 255-258.
- [20] S. De Boni und G.K.E. Scriba; Capillary electrophoresis analysis of hydrolysis, isomerization and enantiomerization of aspartyl model tripeptides in acidic and alkaline solution, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2007**, 43, 49-56.
- [21] S. De Boni et al.; Identification of degradation products of aspartyl tripeptides by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *Electrophoresis*, **2003**, 24, 874-882.
- [22] U. Conrad et al.; Capillary electrophoresis analysis of the degradation of the aspartyl tripeptide Phe-Asp-GlyOH at pH 2.0 and 7.4 under forced conditions, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2010**, 51, 640-648.
- [23] U. Holzgrabe et al.; Why not using capillary electrophoresis in drug analysis?, *Electrophoresis*, **2006**, 27, 2283-2292.
- [24] S. Kopec und U. Holzgrabe; Amino acids: Aspects of impurity profiling by means of CE, *Electrophoresis*, **2007**, 28, 2153-2167.
- [25] *Europäisches Arzneibuch*, **2008**, Europarat, Straßburg, Frankreich.
- [26] *United States Pharmacopeia*, **2009**, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, USA.
- [27] A. Tiselius; Elektrophorese und Adsorptionsanalyse als Hilfsmittel zur Untersuchung hochmolekularer Stoffe und ihrer Zerfallsprodukte - Nobel-Vortrag, 13 Dezember 1948, *Naturwissenschaften*, **1950**, 37, 27-33.
- [28] J.W. Jorgenson und K.D. Lukacs; High-Resolution Separations Based on Electrophoresis and Electroosmosis, *Journal of Chromatography*, **1981**, 218, 209-216.
- [29] K.D. Altria; *Capillary Electrophoresis Guidebook*, **1996**, Humana Press, Totowa, USA.
- [30] J.P. Landers; *Handbook of Capillary Electrophoresis : 2nd Edition*, **1997**, CRC Press, Boca Raton, USA.
- [31] H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt; *Kapillarelektrophorese - Methoden und Möglichkeiten*, **2000**, Vieweg Verlag, Wiesbaden, Deutschland.
- [32] G.J. Janz und R.P.T. Tomkins; *Nonaqueous Electrolytes Handbook*, **1972**, Academic Press, New York, USA.
- [33] W. Weber; Pressure-Dependence of Viscosity of Alcohol-Water Mixtures, *Rheologica Acta*, **1975**, 14, 1012-1025.
- [34] V. Kasicka; Recent advances in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides, *Electrophoresis*, **2003**, 24, 4013-4046.
- [35] V. Kasicka; Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides, *Electrophoresis*, **2006**, 27, 142-175.

- 
- [36] V. Kasicka; Recent developments in CE and CEC of peptides, *Electrophoresis*, **2008**, 29, 179-206.
- [37] J. Dong et al.; Preparation and evaluation of rigid porous polyacrylamide-based strong cation-exchange monolithic columns for capillary electrochromatography, *Journal of Separation Science*, **2007**, 30, 2986-2992.
- [38] I. Miksik und P. Sedlakova; Capillary electrochromatography of proteins and peptides, *Journal of Separation Science*, **2007**, 30, 1686-1703.
- [39] F. Svec; CEC: Selected developments that caught my eye since the year 2000, *Electrophoresis*, **2009**, 30, S68-S82.
- [40] V. Pretorius, B.J. Hopkins, J.D. Schieke; Electro-Osmosis - New Concept for High-Speed Liquid-Chromatography, *Journal of Chromatography*, **1974**, 99, 23-30.
- [41] J.H. Knox und I.H. Grant; Miniaturization in Pressure and Electroendosmotically Driven Liquid-Chromatography - Some Theoretical Considerations, *Chromatographia*, **1987**, 24, 135-143.
- [42] J.H. Knox und K.A. McCormack; Temperature Effects in Capillary Electrophoresis 2: Some Theoretical Calculations and Predictions, *Chromatographia*, **1994**, 38, 215-221.
- [43] K.K. Unger, R. Skudas, M.M. Schulte; Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal, *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1184, 393-415.
- [44] R.M. Seifar et al.; Capillary electrochromatography with 1.8- $\mu$ m ODS-modified porous silica particles, *Journal of Chromatography A*, **1998**, 808, 71-77.
- [45] R.M. Seifar et al.; Electrically driven capillary liquid chromatography at ambient pressure, *Journal of Microcolumn Separations*, **1998**, 10, 41-49.
- [46] C.G. Bailey und C. Yan; Separation of explosives using capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, 3275-3279.
- [47] L. Zhang et al.; Separation of neutral compounds by high speed capillary electrochromatography, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **1999**, 22, 2715-2728.
- [48] L. Zhang et al.; Fast analysis of capillary electrochromatography with non-porous ODS as stationary phase, *Analytical Letters*, **1999**, 32, 2679-2690.
- [49] J.T.G. Overbeek; Thermodynamics of Electrokinetic Phenomena, *Journal of Colloid Science*, **1953**, 8, 420-427.
- [50] B. Behnke, E. Grom, E. Bayer; Evaluation of the Parameters Determining the Performance of Electrochromatography in Packed Capillary Columns, *Journal of Chromatography A*, **1995**, 716, 207-213.
- [51] C. Fujimoto; Charged Polyacrylamide Gels for Capillary Electrochromatographic Separations of Uncharged, Low-Molecular-Weight Compounds, *Analytical Chemistry*, **1995**, 67, 2050-2053.
- [52] C. Fujimoto, J. Kino, H. Sawada; Capillary Electrochromatography of Small Molecules in Polyacrylamide Gels with Electroosmotic Flow, *Journal of Chromatography A*, **1995**, 716, 107-113.

- 
- [53] C. Ericson et al.; Preparation of continuous beds for electrochromatography and reversed-phase liquid chromatography of low-molecular-mass compounds, *Journal of Chromatography A*, **1997**, 767, 33-41.
- [54] E.C. Peters et al.; Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 2. Effect of chromatographic conditions on the separation, *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, 2296-2302.
- [55] L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson; Molecular imprint-based stationary phases for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, **1998**, 817, 5-13.
- [56] Q.L. Tang und M.L. Lee; Capillary electrochromatography using continuous-bed columns of sol-gel bonded silica particles with mixed-mode octadecyl and propylsulfonic acid functional groups, *Journal of Chromatography A*, **2000**, 887, 265-275.
- [57] C.K. Ratnayake, C.S. Oh, M.P. Henry; Characteristics of particle-loaded monolithic sol-gel columns for capillary electrochromatography - I. Structural, electrical and band-broadening properties, *Journal of Chromatography A*, **2000**, 887, 277-285.
- [58] B.H. Xiong et al.; Capillary electrochromatography with monolithic poly(styrene-co-divinylbenzene-co-methacrylic acid) as the stationary phase, *Journal of High Resolution Chromatography*, **2000**, 23, 67-72.
- [59] C. Fujimoto, Y. Fujise, E. Matsuzawa; Fritless packed columns for capillary electrochromatography: Separation of uncharged compounds on hydrophobic hydrogels, *Analytical Chemistry*, **1996**, 68, 2753-2757.
- [60] C. Fujimoto, M. Sakurai, Y. Muranaka; PEEK columns for open-tubular liquid chromatography with electroosmotic flow, *Journal of Microcolumn Separations*, **1999**, 11, 693-700.
- [61] C. Fujimoto; Preparation of fritless packed silica columns for capillary electrochromatography, *Journal of High Resolution Chromatography*, **2000**, 23, 89-92.
- [62] Y. Baba und M. Tsuchioka; Gel-Filled Capillaries for Nucleic-Acid Separations in Capillary Electrophoresis, *Trends in Analytical Chemistry*, **1992**, 11, 280-287.
- [63] L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson; Capillary electrochromatography with predetermined selectivity obtained through molecular imprinting, *Analytical Chemistry*, **1997**, 69, 1179-1183.
- [64] M.R. Schure et al.; High performance capillary gel electrochromatography with replaceable media, *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, 4985-4995.
- [65] C. Ericson und S. Hjerten; Reversed-phase electrochromatography of proteins on modified continuous beds using normal-flow and counterflow gradients. Theoretical and practical considerations, *Analytical Chemistry*, **1999**, 71, 1621-1627.
- [66] J.L. Liao et al.; Preparation of continuous beds derivatized with one-step alkyl and sulfonate groups for capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry*, **1996**, 68, 3468-3472.
- [67] R. Wu et al.; Capillary Electrochromatography for Separation of Peptides Driven with Electrophoretic Mobility on Monolithic Column, *Analytical Chemistry*, **2001**, 73, 4919-4923.
- [68] D. Hoegger und R. Freitag; Acrylamide-based monoliths as robust stationary phases for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, **2001**, 914, 211-222.



- [69] A.H. Que und M.V. Novotny; Separation of neutral saccharide mixtures with capillary electrochromatography using hydrophilic monolithic columns, *Analytical Chemistry*, **2002**, 74, 5184-5191.
- [70] A.H. Que et al.; Coupling capillary electrochromatography with electrospray Fourier transform mass spectrometry for characterizing complex oligosaccharide pools, *Analytical Chemistry*, **2003**, 75, 1684-1690.
- [71] T.J. Tegeler et al.; Microdeposition device interfacing capillary electrochromatography and microcolumn liquid chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **2004**, 76, 6698-6706.
- [72] V. Guryca et al.; Porous polyacrylamide monoliths in hydrophilic interaction capillary electrochromatography of oligosaccharides, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2007**, 70, 3-13.
- [73] H.Y. Huang, H.Y. Lin, S.P. Lin; CEC with monolithic poly(styrene-divinylbenzene-vinylsulfonic acid) as the stationary phase, *Electrophoresis*, **2006**, 27, 4674-4681.
- [74] H.Y. Huang, Y.C. Liu, Y.J. Cheng; Development of capillary electrochromatography with poly(styrene-divinylbenzene-vinylbenzenesulfonic acid) monolith as the stationary phase, *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1190, 263-270.
- [75] T. Ikegami et al.; Preparation of highly efficient monolithic silica capillary columns for the separations in weak cation-exchange and HILIC modes, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2007**, 70, 31-37.
- [76] J. Krenkova et al.; High binding capacity surface grafted monolithic columns for cation exchange chromatography of proteins and peptides, *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, 6824-6830.
- [77] X. Chen, H.D. Tolley, M.L. Lee; Polymeric cation-exchange monolithic columns containing phosphoric acid functional groups for capillary liquid chromatography of peptides and proteins, *Journal of Chromatography A*, **2010**, 1217, 3844-3854.
- [78] H. Fu et al.; Monolithic columns with mixed modes of reversed-phase and anion-exchange stationary phase for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1044, 237-244.
- [79] Y. Li et al.; Preparation of polymeric monoliths by copolymerization of acrylate monomers with amine functionalities for anion-exchange capillary liquid chromatography of proteins, *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, 5525-5532.
- [80] M. Dong et al.; Coupling strong anion-exchange monolithic capillary with MALDI-TOF MS for sensitive detection of phosphopeptides in protein digest, *Analytical Chemistry*, **2010**, 82, 2907-2915.
- [81] F. Ye, Z. Xie, K.Y. Wong; Monolithic silica columns with mixed mode of hydrophilic interaction and weak anion-exchange stationary phase for pressurized capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, **2006**, 27, 3373-3380.
- [82] F. Ye, S. Wang, S. Zhao; Preparation and characterization of mixed-mode monolithic silica column for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, 8845-8850.
- [83] A. Palm und M.V. Novotny; Macroporous polyacrylamide poly(ethylene glycol) matrixes as stationary phases in capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry*, **1997**, 69, 4499-4507.

- 
- [84] I. Gusev, X. Huang, C. Horvath; Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, **1999**, 855, 273-290.
- [85] J. Dong et al.; Specific capture of phosphopeptides by Zr<sup>4+</sup>-modified monolithic capillary column, *Journal of Separation Science*, **2007**, 30, 2917-2923.
- [86] C.H. Xie et al.; Preparation of monolithic silica column with strong cation-exchange stationary phase for capillary electrochromatography, *Journal of Separation Science*, **2005**, 28, 751-756.
- [87] F. Svec und J.M.J. Frechet; Continuous Rods of Macroporous Polymer As High-Performance Liquid-Chromatography Separation Media, *Analytical Chemistry*, **1992**, 64, 820-822.
- [88] I.M. Lazar et al.; Microfluidic device for capillary electrochromatography-mass spectrometry, *Electrophoresis*, **2003**, 24, 3655-3662.
- [89] V. Augustin et al.; In situ synthesis of monolithic stationary phases for electrochromatographic separations: Study of polymerization conditions, *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1119, 80-87.
- [90] S. Eeltink et al.; Controlling the surface chemistry and chromatography properties of methacrylate-ester-based monolithic capillary columns via photografting, *Journal of Separation Science*, **2007**, 30, 407-413.
- [91] B. Carbonnier et al.; CEC separation of aromatic compounds and proteins on hexylamine-functionalized N-acryloxysuccinimide monoliths, *Journal of Separation Science*, **2007**, 30, 3000-3010.
- [92] M. Guerrouache et al.; In situ functionalization of N-acryloxysuccinimide-based monolith for reversed-phase electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1149, 368-376.
- [93] R.A. Copeland; *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, **2000**, Wiley, New York, USA.
- [94] Z. Glatz; Determination of enzymatic activity by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2006**, 841, 23-37.
- [95] S. Michan und D. Sinclair; Sirtuins in mammals: insights into their biological function, *Biochemical Journal*, **2007**, 404, 1-13.
- [96] A.F. Straight et al.; Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity, *Cell*, **1999**, 97, 245-256.
- [97] M.M. Cockell, S. Perrod, S.M. Gasser; Analysis of Sir2p domains required for rDNA and telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, **2000**, 154, 1069-1083.
- [98] N. Roy und K.W. Runge; Two paralogs involved in transcriptional silencing that antagonistically control yeast life span, *Current Biology*, **2000**, 10, 111-114.
- [99] A.J. Klar, S. Fogel, K. Macleod; MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, *Genetics*, **1979**, 93, 37-50.
- [100] J. Rine und I. Herskowitz; Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, **1987**, 116, 9-22.

- 
- [101] J.S. Smith et al.; A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2000**, 97, 6658-6663.
- [102] S. Minucci und P.G. Pelicci; Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer, *Nature Reviews Cancer*, **2006**, 6, 38-51.
- [103] H. Vaziri et al.; hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase, *Cell*, **2001**, 107, 149-159.
- [104] S.M. Gasser und M.M. Cockell; The molecular biology of the SIR proteins, *Gene*, **2001**, 279, 1-16.
- [105] C. Witschi und E. Doelker; Peptide degradation during preparation and in vitro release testing of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, **1998**, 171, 1-18.
- [106] L.M. Cong et al.; Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 569, 157-168.
- [107] J.H. Knox; Terminology and Nomenclature in Capillary Electroseparation Systems, *Journal of Chromatography A*, **1994**, 680, 3-13.
- [108] E.C. Peters et al.; Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 1. Fine control of porous properties and surface chemistry, *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, 2288-2295.
- [109] E.C. Peters et al.; Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry*, **1997**, 69, 3646-3649.
- [110] M. Lammerhofer et al.; Chiral monolithic columns for enantioselective capillary electrochromatography prepared by copolymerization of a monomer with quinidine functionality. 1. Optimization of polymerization conditions, porous properties, and chemistry of the stationary phase, *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 4614-4622.
- [111] E.F. Hilder, F. Svec, J.M. Frechet; Development and application of polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1044, 3-22.
- [112] E.F. Hilder, F. Svec, J.M. Frechet; Polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, **2002**, 23, 3934-3953.
- [113] F. Svec et al.; Monolithic stationary phases for capillary electrochromatography based on synthetic polymers: Designs and applications, *Journal of High Resolution Chromatography*, **2000**, 23, 3-18.
- [114] F. Svec; My favorite materials: Porous polymer monoliths, *Journal of Separation Science*, **2009**, 32, 3-9.
- [115] P. Holdšvendová et al.; Methacrylate monolithic columns for capillary liquid chromatography polymerized using ammonium peroxodisulfate as initiator, *Journal of Separation Science*, **2003**, 26, 1623-1628.
- [116] V. Bernabé-Zafón et al.; Comparison of thermal- and photo-polymerization of lauryl methacrylate monolithic columns for CEC, *Electrophoresis*, **2009**, 30, 1929-1936.

- [117] T. Koide und K. Ueno; Enantiomeric separations of acidic and neutral compounds by capillary electrochromatography with beta-cyclodextrin-bonded positively charged polyacrylamide gels, *Journal of High Resolution Chromatography*, **2000**, 23, 59-66.
- [118] A.R. Ivanov, C. Horvath, B.L. Karger; High-efficiency peptide analysis on monolithic multimode capillary columns: Pressure-assisted capillary electrochromatography/capillary electrophoresis coupled to UV and electrospray ionization-mass spectrometry, *Electrophoresis*, **2003**, 24, 3663-3673.
- [119] S.P. Porras, M.L. Riekkola, E. Kenndler; Electrophoretic mobilities of cationic analytes in non-aqueous methanol, acetonitrile and their mixtures - Influence of ionic strength and ion-pair formation, *Journal of Chromatography A*, **2001**, 924, 31-42.
- [120] S. Sabah; Stereoisomerentrennung von Aspartyl- und iso-Aspartyl-Peptiden mit der Kapillarelektrophorese, *Dissertation*, **1998**, pharm.Chemie, WWU, Münster, Deutschland.
- [121] U. Conrad; Stereoisomeranalytik von Peptiden - Stabilitätsuntersuchungen von Aspartyl- und Asparaginyl-Tripeptiden mittels Kapillarelektrophorese und Enantiomerentrennung mit HPLC, *Dissertation*, **2009**, pharm./med.Chemie, FSU, Jena, Deutschland.
- [122] S. De Boni; Degradation of Aspartyl Peptides, *Dissertation*, **2004**, pharm./med.Chemie, FSU, Jena, Deutschland.
- [123] T. Wehr, R. Rodríguez-Díaz, M. Zhu; *Capillary Electrophoresis of Proteins*, **1999**, Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- [124] W.C. Chan und P.D. White; *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A practical approach*, **2000**, Oxford University Press, Oxford, Großbritannien.
- [125] G. Gao et al.; Determination of lysine pK values using [5-<sup>13</sup>C]lysine: application to the lyase domain of DNA Pol beta, *Journal of the American Chemical Society*, **2006**, 128, 8104-8105.
- [126] S.D. Arnett und C.E. Lunte; Investigation of the mechanism of pH-mediated stacking of anions for the analysis of physiological samples by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **2003**, 24, 1745-1752.
- [127] D.J. Weiss, K. Saunders, C.E. Lunte; pH-mediated field-amplified sample stacking of pharmaceutical cations in high-ionic strength samples, *Electrophoresis*, **2001**, 22, 59-65.
- [128] P. Britz-McKibbin und D.D. Chen; Selective focusing of catecholamines and weakly acidic compounds by capillary electrophoresis using a dynamic pH junction, *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 1242-1252.
- [129] M.C. Breadmore; Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips, *Electrophoresis*, **2007**, 28, 254-281.
- [130] Z. Malá et al.; Contemporary sample stacking in CE: a sophisticated tool based on simple principles, *Electrophoresis*, **2007**, 28, 243-253.
- [131] K. Imami et al.; Simple on-line sample preconcentration technique for peptides based on dynamic pH junction in capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1148, 250-255.
- [132] B. Heltweg et al.; Nonisotopic substrate for assaying both human zinc and NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases, *Analytical Biochemistry*, **2003**, 319, 42-48.

- 
- [133] K.T. Howitz et al.; Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan, *Nature*, **2003**, 425, 191-196.
- [134] M.S. Cosgrove et al.; The structural basis of sirtuin substrate affinity, *Biochemistry*, **2006**, 45, 7511-7521.
- [135] A.L. Garske und J.M. Denu; SIRT1 top 40 hits: use of one-bead, one-compound acetyl-peptide libraries and quantum dots to probe deacetylase specificity, *Biochemistry*, **2006**, 45, 94-101.
- [136] Y. Liu et al.; High-throughput assays for sirtuin enzymes: a microfluidic mobility shift assay and a bioluminescence assay, *Analytical Biochemistry*, **2008**, 378, 53-59.
- [137] G. Blander et al.; SIRT1 shows no substrate specificity in vitro, *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 9780-9785.
- [138] Enzo Life Sciences; Produktinformationsblatt zu Fluor de Lys-SIRT1, [www.enzolifesciences.com/fileadmin/enzo/BML/ki177.pdf](http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/enzo/BML/ki177.pdf), **2009**.
- [139] C.M. Grozinger et al.; Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening, *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, 276, 38837-38843.
- [140] J. Trapp et al.; Structure-activity studies on suramin analogues as inhibitors of NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases (sirtuins), *ChemMedChem*, **2007**, 2, 1419-1431.
- [141] A. Mai et al.; Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (Sirtuin) inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, 48, 7789-7795.
- [142] J. Trapp et al.; Adenosine mimetics as inhibitors of NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases, from kinase to sirtuin inhibition, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, 49, 7307-7316.
- [143] R.C. Neugebauer et al.; Structure-activity studies on splitomicin derivatives as sirtuin inhibitors and computational prediction of binding mode, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 51, 1203-1213.

## 10 Anhang

### Curriculum vitae

#### Persönliche Daten

Name: Ronny Ludewig  
Geburtsdatum: 24. Januar 1981  
Geburtsort: Bad Langensalza  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

#### Schulbildung

09/1987 – 08/1991 Grundschule POS „Friedrich Engels“ in Aschara, Thüringen  
09/1991 – 07/1999 Salza-Gymnasium in Bad Langensalza, Thüringen  
07/1999 Allgemeine Hochschulreife / Abitur

#### Zivildienst

11/1999 – 09/2000 Zivildienst bei der Johanniter Unfallhilfe in Bad Langensalza

#### Hochschulbildung

10/2000 – 10/2004 Studium der Pharmazie an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena  
02/2005 – 07/2005 Pharmaziepraktikant in der Amalien-Apotheke in Bad Langensalza  
08/2005 – 03/2006 Diplomand am Institut für medizinische/pharmazeutische Chemie in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Jochen Lehmann an der FSU Jena  
Thema: Untersuchungen zur Biotransformation von PETN und PETriN  
04/2006 Erteilung der Approbation als Apotheker  
11/2006 Erteilung des Titels Diplom-Pharmazeut

#### Promotion

Seit 04/2006 Doktorand, Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für pharmazeutische/medizinische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Arbeitskreis: Prof. Dr. Gerhard Scriba  
Promotionsthema: Elektromigrationsverfahren in der Peptidanalytik

#### Wissenschaftliche Tätigkeiten

Seit 04/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für pharmazeutische/medizinische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena  
02/2009 – 03/2009 Arbeitsaufenthalt in Dalian, China (DICP, Dalian Institute of Chemical Physics) in der Arbeitsgruppe Prof. Hanfa Zou

## Publikations- und Tagungsbeitragsverzeichnis

### Publikationen

1. Yi Fan, Ronny Ludewig, Diana Imhof, Gerhard K. E. Scriba; Development of a capillary electrophoresis-based assay of sirtuin enzymes, *Electrophoresis* 2008, 29, 3717-3723
2. Yi Fan, Ronny Ludewig, Gerhard K. E. Scriba; Fmoc-Peptides as Substrates in a Capillary Electrophoresis-Based Assay for Sirtuin Enzymes, *Analytical Biochemistry* 2009, 387, 243-248
3. Ronny Ludewig, Jing Dong, Hanfa Zou, Gerhard K.E. Scriba; Separation of peptides diastereomers using CEC and a hydrophobic monolithic column, *Journal of Separation Science* 2010, 33, 1085 - 1089.
4. Ronny Ludewig, Sandor Nietzsche, Gerhard K.E. Scriba; A weak cation-exchange monolith as stationary phase for the separation of peptide diastereomers by capillary electrochromatography, 2010 *eingereicht*.
5. Jing Lu, Min Ji, Ronny Ludewig, Gerhard K. E. Scriba, Dong-ying Chen; Application of phase optimized liquid chromatography to oligopeptide separations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010, 51, 764 - 767.

### Wissenschaftliche Tagungen

10/2007	DPhG Jahrestagung	Erlangen
09/2008	ISC 2008	Münster
10/2008	DPhG Jahrestagung	Bonn
01/2009	GDCh Doktorandenseminar	Hohenroda
06/2009	HPLC 2009	Dresden
09/2009	DPhG Jahrestagung	Jena
01/2010	Sino German Closing Workshop	Dalian, China
03/2010	MSB 2010	Prag

## Tagungsbeiträge

### *Poster*

1. Yi Fan, Ronny Ludewig, Gerhard K. E. Scriba, Assay of Sirtuin Enzymes Based on Capillary Electrophoresis, 27<sup>th</sup> International Symposium of Chromatography, 21.-25. September 2008, Münster
2. Ronny Ludewig, Yi Fan, Gerhard K. E. Scriba, Capillary Electrophoresis Assay of Sirtuin Enzymes, DPhG Jahrestagung, 8.-11. Oktober 2008, Bonn
3. Ronny Ludewig, Uwe Conrad, Jing Dong, Hanfa Zou, Gerhard K.E. Scriba, Separation of Peptide Diastereomers Using Capillary Electrochromatography, GDCh, HPLC 2009, 28. Juni – 02. Juli 2009, Dresden
4. Yi Fan, Ronny Ludewig, Gerhard K. E. Scriba, Development of In-Capillary Assay for Sirtuin Enzymes, GDCh, HPLC 2009, 28. Juni - 02. Juli 2009, Dresden
5. Ronny Ludewig, Uwe Conrad, Jing Dong, Hanfa Zou, Gerhard K.E. Scriba, Capillary Electrochromatography for Separation of Peptide Diastereomers on a Hydrophobic Monolith, DPhG Jahrestagung, 29. September - 01. Oktober 2009, Jena
6. Ronny Ludewig, Jing Dong, Hanfa Zou, Gerhard K.E. Scriba; Separation of Peptide Diastereomers using Capillary Electrochromatography and a Hydrophobic Monolithic Column - Comparison to a Weak Cation Exchange Monolith -, 25<sup>th</sup> International Symposium on Microscale BioSeparations 2010, 21.-25. März 2010, Prag

### *Vorträge*

1. Ronny Ludewig, Yi Fan, Gerhard K. E. Scriba, Capillary Electrophoresis Assay of Sirtuin Enzymes, GDCh, 19. Doktorandenseminar, 11.-13. Januar 2009, Hohenroda
2. Ronny Ludewig, Jing Dong, Hanfa Zou, Gerhard K.E. Scriba, CEC, Separation of Peptide Diastereomers by Capillary Electrochromatography on a Hydrophobic Monolith, Sino German Closing Workshop, 10.-13. Januar 2010, Dalian, China



## **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich,

dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist. Die vorliegende Arbeit habe ich selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt. Ich habe weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen im Zusammenhang mit dem Inhalt meiner Dissertation an Dritte erbracht. Die vorliegende Dissertation habe ich ausschließlich an der Friedrich-Schiller-Universität als Prüfungsarbeit eingereicht.

Jena, den 25.08.2010

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Ronny Ludwig', with a long, sweeping horizontal stroke extending to the right.